

56917

Методические
вопросы

*ИЗУЧЕНИЯ
ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ
ПЛАНКТОНА ВНУТРЕННИХ
ВОДОЕМОВ*

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД
им. И. Д. ПАПАНИНА

Методические вопросы
*ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ
ПРОДУКЦИИ
ПЛАНКТОНА ВНУТРЕННИХ
ВОДОЕМОВ*



Санкт-Петербург Гидрометеоиздат 1993

Обсуждаются теоретические основы и методика определения интенсивности фотосинтеза, дыхания и содержания пигментов пресноводного фитопланктона, продуктивности отдельных видов водорослей, энергии подводной фотосинтетически активной радиации, рассмотрено значение показателей первичной продукции для оценки трофического состояния водоемов.

Рассчитана на специалистов, работающих в области альгологии, общей гидро-биологии, лимнологии.

Ответственный редактор И. Л. Пырина

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. Д. ПАПАНИНА
АН СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИЗДАНИЕ 56917

М 1502000000 — 041
069 (02) — 93 Без объявл.

ISBN 5—286—01105—5

© Институт биологии
внутренних вод
им. И. Д. Папанина

ПРЕДИСЛОВИЕ

Сборник содержит статьи, написанные на основании материалов совещания по вопросам методики изучения первичной продукции пресноводного планктона, которое состоялось в Борке в мае 1989 г. О необходимости проведения такого совещания высказывался Г. Г. Винберг. Это было вызвано распространением к тому времени в работах по первичной продукции биофизических и биохимических методов, которые привлекали внимание широкого круга исследователей возможностью подойти к автоматической и дистанционной регистрации показателей продуктивности фитопланктона, к дифференцированной оценке вклада отдельных его представителей, к определению их физиологического состояния. Требовалось рассмотреть достоинства и недостатки этих методов в сравнении с традиционными, остающимися все же единственно приемлемыми при изучении многих внутренних водоемов, куда ограничен доступ оборудованного транспорта. В обсуждении нуждались также проблемы, касающиеся экологии подводного фотосинтеза (изолирование экспериментальных проб, зависимость от светового фактора, содержания хлорофилла и других пигментов, взаимосвязь с дыханием планктона), а также использования показателей первичной продукции для трофической классификации водоемов, чему уделено сравнительно мало внимания в изданных ранее методических руководствах.

Все эти вопросы в той или иной степени отражены в составляющих книгу статьях, которым стремились придать целенаправленный характер как их авторы, так и редакторский коллектив — В. В. Бульон, В. М. Гольд, Н. М. Минеева, Л. Е. Сигарева. Хотелось бы выразить искреннюю благодарность за их энтузиазм, проявленный в работе над книгой. Посвящается она памяти Г. Г. Винберга, заложившего основы изучения первичной продукции водоемов нашей страны, специальный интерес которого к данной проблеме способствовал развитию методологии исследований в этой области гидробиологии.

И. Л. Пырина

О. М. Кожова

*Научно-исследовательский институт
биологии при Иркутском университете*

СТРАТЕГИЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ КАК НАЧАЛЬНОГО ЗВЕНА ПРОДУКЦИОННОГО ПРОЦЕССА В ВОДОЕМЕ

Рассмотрены актуальные проблемы первичной продукции фитопланктона внутренних водоемов и методические аспекты их изучения.

При разработке той или иной экологической проблемы неизбежно встает вопрос о соотношении продуцирования органического вещества с тратами на жизнеобеспечение живых организмов и поддержание необходимого гомеостаза биосферы.

Первая из этих проблем нашла отражение в работах 60-х годов, проводимых в рамках Международной биологической программы (МБП) и возглавляемых у нас в стране Г. Г. Винбергом. Было получено достаточно полное представление о процессе первичного продуцирования и его носителе — хлорофилле в водоемах всех географических зон СССР. Это дало возможность разработать математические модели, с разной степенью адекватности имитирующие водные экосистемы. В итоге была выработана „единая мера“ оценки их функционирования в отношении выражения количества вещества и энергии, а также методология исследования.

Дальнейшее развитие этого направления показало необходимость выявления изменчивости процесса первичного продуцирования не только в сезонном или иных аспектах, но и в целом как источника эволюции экологических процессов. Важность такого подхода очевидна, поскольку изменчивость экосистемы и слагающих их объектов с присущими им функциональными особенностями приводит к возникновению нового уровня адаптации и является регулятором устойчивости экосистемы.

Проблема познания и практическая значимость процесса изменчивости экосистемы, в том числе ее основного в энергетическом отношении компонента — первичной продукции, приобрела особенно острый характер в последние десятилетия, когда поиск

путей обеспечения возросших потребностей человечества стал условием его выживания на Земле. Возникла необходимость понимания процессов, поддерживающих гомеостаз экосистем и биосферы в целом. Совершенно очевидно, что лидирующая роль в создании гомеостаза биосферы принадлежит автотрофным организмам, продуцирующим первичное органическое вещество и кислород и служащим основным связующим звеном системы солнечная энергия — атмосфера — биосфера. Без знания закономерностей процесса первичного продуцирования невозможно количественное описание потока веществ антропогенного происхождения при анализе его внедрения в естественные биогеохимические циклы, как и создание специальных контролируемых систем для рассеивания энергии загрязнителей и их детоксикации.

В прежних исследованиях первичная продукция рассматривалась в основном как интегральная характеристика водных экосистем, представленная осредненными и в какой-то мере постоянными для данного водоема величинами. Однако анализ ее временной изменчивости показывает, что для изучения фотосинтеза планктона как экологического процесса более информативно рассмотрение его в динамике. Именно такой подход позволяет выявить фазы единого природного цикла временного течения первичной продукции, аналогичные фазам циклов численности, описываемых популяционной экологией: тренды, тенденции изменений, переход с одного уровня гомеостаза на другой. В этом заключается экологическая основа понимания процесса, необходимая для контроля и прогнозирования состояния водных систем. Оценка фаз сукцессий и трендов временных изменений фитопланктона со всей остротой поставила вопрос о необходимости более тесной сопряженности исследований функциональных и структурно-биоценологических параметров экосистем [7].

Долговременная периодичность процесса первичного продуцирования, очевидно, связана с изменениями общей климатической ситуации в том или ином регионе [6, 10]. При ее оценке можно столкнуться с двумя проблемами: с наличием короткопериодных циклов, кажущихся на первый взгляд стохастическими, и со слабой связью между многолетними изменениями первичной продукции и состава фитопланктона. В таком случае при изучении временной изменчивости особенно важно оперировать данными круглогодичных наблюдений.

Подчеркивая необходимость получения долговременных рядов для выявления периодичности в динамике первичной продукции фитопланктона, следует предостеречь от попыток механически связывать количество сезонных максимумов фотосинтеза и концентраций хлорофилла „а“ с трофическим типом водоема. Так, один максимум отмечается и в эвтрофных водах и в ультраолиготрофных. Поэтому необходимо учитывать не только количество максимумов, но также их уровень и продолжительность.

Необходимость получения обобщенных характеристик продукционного процесса ставит вопрос о репрезентативности данных, связанной с выбором сети станций, частотой отбора проб и точностью проводимых измерений. Если выбор пространственного шага слежения за горизонтальной изменчивостью первичной продукции — задача достаточно тривиальная (число станций должно адекватно отражать разнообразие биотопов), то анализ вертикального профиля фотосинтеза заслуживает специального рассмотрения. Ошибку в величину первичной продукции, рассчитываемую для столба воды, может внести игнорирование глубины распространения фотосинтеза и местоположения его максимума. Особенно важен правильный выбор границы фотосинтезирующей зоны в олиготрофных водах, где она достигает значительных глубин. Для правильного выбора исследуемых горизонтов целесообразно проводить непрерывное зондирование температуры, облученности и концентраций хлорофилла. При дальнейшем анализе и расчете первичной продукции следует учитывать характер их вертикального распределения, а также режим температурной стратификации, особенно если слой скачка лежит выше границы эвфотной зоны. В период летней стагнации снижение первичной продукции может быть вызвано и ограничением подтока биогенных элементов из афотической зоны.

Для расшифровки причинно-следственных связей процесса первичного продуцирования целесообразно применять методы математического моделирования. Такой подход реализуется с помощью эмпирических моделей, позволяющих разработать эффективные прогнозы при условии использования долговременных рядов наблюдений и значительного числа учитываемых факторов среды. В связи с тем что природные системы характеризуются гибкостью по отношению к внешним воздействиям, в моделируемом объекте в те или иные моменты происходит перестройка причинно-следственных связей. Поэтому следует отдавать предпочтение эмпирическим моделям гибкой структуры, целесообразным не только из-за наличия перестроек в системе, но и при недостатке информации. Особенно эффективны методы, в которых синтез моделей осуществляется с применением принципа внешнего дополнения [3]. Еще более надежные результаты дают специализированные прогнозирующие системы, объединяющие отдельные предикторы (прогнозные модели) в коллективе [2].

Поскольку в природе все факторы среды действуют в совокупности и трудно разграничить роль каждого из них в продукционном процессе, для понимания механизмов изменчивости первичной продукции полезны лабораторные эксперименты. Они позволяют непосредственно оценить влияние различных факторов на величину первичной продукции планктона конкретного водоема и дать прогноз его продуктивности при изменении условий. Результативность исследований такого рода тем выше, чем боль-

ший набор факторов и типов планктонных сообществ подвергнут экспериментальному анализу, а информация о них доступна для сравнения. Последнее можно достичь с использованием гидробиологической информационной системы (ГИС). Это необходимо и в связи с тем, что влияние света, температуры и биогенных элементов на величину первичной продукции планктона даже в одном водоеме в течение вегетационного периода проявляется по-разному [8].

Дополнительную информацию для понимания механизмов регулирования процесса фотосинтеза могут дать эксперименты с чистыми культурами водорослей, хотя их результаты трудно адаптировать к реальным природным условиям, поскольку не учитывается действие фактора внутрибиocenотических взаимоотношений.

Первичная продукция должна стать одним из основных критериев оценки эффективности очистки бытовых и промышленных стоков, поступающих в водосмы. В местах выпуска сточных вод отмечаются серьезные перестройки структурно-функциональных характеристик фитопланктона. В то же время эксперименты показывают, что фотосинтез менее чувствителен к воздействию химических веществ, чем другие показатели жизнедеятельности водорослей. Для понимания этого противоречия требуются специальные исследования. Поиск может идти по пути выявления закономерностей сопряженной изменчивости фотосинтеза и концентрации хлорофилла. Нарушение такой сопряженности („разбалансированность“) отмечено, например, в районе сброса промышленных предприятиями слаботоксичных сточных вод, действие которых практически не отражается на диапазоне изменчивости величин фотосинтеза и содержания хлорофилла „а“, если их рассматривать порознь [5].

Для математического моделирования первичной продукции и характеристики продукционных возможностей фитопланктона важное значение имеет оценка его ассимиляционной активности, показателем которой служит величина отношения максимальной интенсивности фотосинтеза к биомассе водорослей (П/Б-коэффициент) или концентрации хлорофилла „а“. (ассимиляционное число АЧ). В связи с распространением инструментальных методов анализа хлорофилла ассимиляционные числа используют чаще, чем П/Б-коэффициент, хотя последние более информативны при рассмотрении сукцессий сообщества, так как позволяют учитывать видовой состав водорослей. Поэтому важнейшей задачей продукционной биологии является оценка динамики фотосинтетической активности популяций водорослей, для чего необходимы сведения о толерантности водорослей на популяционном уровне. Одним из способов их получения может быть экспериментально-натурное изучение интенсивности нарастания численности водорослей с установлением особенностей популяционных параметров

(размножение, смертность, изменчивость размеров клеток и т. д.) в меняющихся условиях среды [4, 9].

Для понимания механизмов сукцессии альгоценозов весьма результативен анализ первичной продукции разных размерных фракций фитопланктона. Таким путем возможно предвидеть замену водорослей одного размера другими при изменении условий среды (экзогенные причины), в частности в процессе эвтрофирования водоема. Имеющиеся в настоящее время суждения по этой проблеме достаточно противоречивы. Остается открытым вопрос, насколько видоспецифична ассимиляционная активность водорослей, как она зависит от размерной и возрастной структуры популяции, от особенностей физиологической адаптации к постоянно меняющимся факторам среды. Не исключено, что последнее имеет определенное значение для ассимиляционной способности вида. Доказано, например, наличие регуляции первичных реакций фотосинтеза в соответствии с изменениями физиологического состояния клетки в онтогенезе, а также условий минерального и углеродного питания [1].

Таким образом, при экологическом подходе к описанию первичной продукции фитопланктона возникает необходимость познания физиологических и биохимических механизмов этого процесса. Вместе с тем, экосистемный подход позволяет наметить наиболее важные аспекты физиологии и биохимии водорослей, подлежащие первоочередному исследованию, и определить критерии, необходимые для понимания закономерностей процесса фотосинтеза в меняющихся условиях водной среды. Преимущество останется за теми физиолого-биохимическими методами, которые можно использовать в исследованиях *in situ*. Из них наилучшими станут те, которые позволят дистанционно регистрировать изменение продукционных параметров водорослей в естественных условиях обитания. Иными словами, от выяснения макрозависимостей между отдельными характеристиками продуктивности фитопланктона надо идти к познанию механизмов изменчивости фотосинтеза в условиях природной среды, рассматривая первичное продуцирование как основу функционирования и устойчивости экосистемы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Венедиктов П. С. Первичные процессы фотосинтеза и физиологическое состояние растительной клетки: Автореф. дис...докт. биол. наук. Москва, 1990.
2. Герцекевич Д. А. Программа синтеза эмпирических моделей по количеству частных описаний: Информ. листок о науч.-техн. достижениях. Иркутск, 1981.
3. Герцекевич Д. А., Измestьева Л. Р., Паутова В. Н. Эмпирические модели гибкой структуры динамики хлорофилла // Долгосрочное прогнозирование состояния экосистем. Новосибирск, 1988.

4. Елизарова В. А. Результаты экспериментального изучения скорости размножения фитопланктона в прибрежье Рыбинского водохранилища // Основы изучения пресноводных экосистем. Л., 1981.
5. Измestьева Л. Р. Закономерности изменчивости процессов первичного продуцирования в водоемах Байкальского региона. Фотосинтетические пигменты // Байкальск. 1989. Деп. в ВИНИТИ. 03.01.1989, № 57-В-89.
6. Измestьева Л. Р., Кожова О. М., Усенко Н. Б. Динамика хлорофилла «a» в сестоке Иркутского водохранилища // Гидробиол. журн. 1990. Т. 26, № 1.
7. Измestьева Л. Р., Паутова В. Н., Кожова О. М. Анализ структурно-функциональных связей в фитопланктоне и прогноз состояния озерных водоемов // Прогнозирование экологических процессов. Новосибирск, 1986.
8. Измestьева Л. Р., Паутова В. Н., Лопатина Н. И. Оценка роли экологических факторов в динамике первичной продукции фитопланктона // Долгосрочное прогнозирование состояния экосистем. Новосибирск, 1988.
9. Кожова О. М. Фитопланктон Иркутского водохранилища // Биология Иркутского водохранилища. М., 1964.
10. Trifonova I. S. Oligotrophic-eutrophic succession of lake phytoplankton // Algae and the aquatic environment. Bristol. 1988.

И. Л. Пырина

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН*

КИСЛОРОДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ФИТОПЛАНКТОНА

Обсуждается метод определения фотосинтеза фитопланктона по изменению содержания кислорода в изолированных пробах воды, его применимость, ограничения, особенности техники, необходимые для получения точных данных.

Изучение фотосинтезирующей деятельности фитопланктона начиналось с регистрации изменения содержания кислорода в пробе воды иодометрическим методом Винклера [14], и первые такие определения были проведены в конце прошлого века в небольшом пруду [8].

На морских водоемах подобные работы начаты позднее Пюттером (цит. по [5]). Шире кислородный метод стали использовать в лимнологических исследованиях в 20-е годы текущего столетия, а у нас в стране — с 1932 г. [4].

С тех пор появились другие, достаточно совершенные, приемы определения подводного фотосинтеза, основанные на измерении показателей, поддающихся регистрации современной аналитической аппаратурой. И все же оценка скорости этого процесса по изменению содержания кислорода в заключенных в склянку пробах воды (метод „светлых” и „темных” склянок) по-прежнему находит большое применение. Особенно широко распространен этот метод в исследованиях пресных водоемов, часто проводимых с небольших плавсредств, где сложные химические анализы невозможны. Лишь в малопродуктивных водах использование кислородного метода ограничено недостаточной чувствительностью. Показателем его пригодности для таких вод служит концентрация хлорофилла, которая не должна быть ниже 1 мкг/л [6,13].

Кислородный метод предпочтителен для определения фотосинтеза в водной среде и теоретически, поскольку в ней сравнительно невелико содержание кислорода и его изменения хорошо обнаруживаются. Заметим, что газообмен в процессе фотосинтеза и дыхания сухопутных растений чаще изучают по углекислоте, количество которой в воздухе гораздо ниже, чем кислорода [2].

Особенности и применимость кислородного метода рассмотрены в ряде обзорных и методических работ [2,3, 5—7, 9—11, 13].

Метод привлекает простотой процедуры эксперимента. Исследуемая вода со всеми предосторожностями, необходимыми при анализе кислорода [1], разливается в несколько склянок, две из которых служат для измерения исходного содержания кислорода, остальные (две — „темные” и две-три — „светлые”) экспонируют от 1—2 ч до 1 сут в определенных условиях освещения. Число повторностей может быть больше, особенно для „светлого” варианта. После экспозиции в склянках определяют кислород. По разнице его концентраций в „светлых” и „темных” склянках судят об интенсивности фотосинтеза за данный отрезок времени, по разности концентраций в исходной воде и „темных” склянках — о дыхании и других процессах биохимического окисления. Последнее важно для понимания результатов эксперимента и, кроме того, служит источником информации о деструкции органического вещества в водоеме. Концентрация кислорода может быть определена классическим иодометрическим методом Винклера с точностью $\pm 0,02$ мг O_2 /л, для чего 50 мл пробы с освобожденным йодом титруют 0,01 н раствором тиосульфата, отмеренным бюреткой с ценой деления 0,02 мл, добавляя в качестве индикатора крахмал. В последние годы получила распространение модификация этого метода при так называемом обратном титровании, которое производится раствором йодата калия (KIO_3) после добавления в пробу со свободным йодом избыточного количества тиосульфата. При этом конец титрования устанавливается амперометрически [10, 12]. Этот метод менее трудоемок и позволяет анализировать кислород в небольших (до 10 мл) порциях воды с той же точностью $\pm 0,02$ мг O_2 /л. Однако успешное его использование возможно лишь при наличии приспособлений для автоматического отмеривания и смешивания растворов, а также регистрации конца титрования, что затруднительно в полевых условиях. Наиболее просто и быстро содержание кислорода в испытуемых пробах определяется электрохимически с помощью оксиметров, но этот прибор малочувствителен ($\pm 0,1$ мг O_2 /л) и применим лишь для высокопродуктивных вод.

Надежность результатов определения фотосинтеза скляночным кислородным методом достигается строгим соблюдением необходимой процедуры эксперимента.

1. Следует избегать пребывания на свету склянок, заполненных водой, особенно поднятой с глубоких горизонтов.

2. Необходимо следить, за тем чтобы в склянках не образовывались пузырьки газа в процессе заполнения водой или ее нагревания на воздухе после извлечения из водоема. Для этого рекомендуется наполнять склянки по возможности при низкой температуре, оставляя их открытыми до тех пор, пока улетучатся

пузырьки, если они появляются. Закрывая склянку, надо стараться, чтобы газовый пузырек не оставался под пробкой, для чего пробку следует вводить строго вертикально, а ее нижний край делать скошенным или конусообразным. При фиксации после опыта желательно сохранять газовый пузырек, если он образовался, тогда содержащийся в нем кислород прореагирует с реактивами наравне с растворенным.

3. Объем склянок должен составлять 100—300 мл. Можно рекомендовать склянки типа „кислотные” — с притертой пробкой и колпачком. Колпачок со шлифом позволяет создать вокруг пробки „водяную рубашку”, что предохраняет пробу от воздуха и посторонней воды, которые при изменении температуры проникают даже под очень хороший шлиф.

4. Необходимо следить за тем, чтобы в „темные” склянки не попадал свет. Для этого их заворачивают в несколько слоев темной ткани или пластиковой пленкой. Если используются мешки, необходимо, чтобы их швы были плотные. Под оберткой не должен оставаться воздух, препятствующий погружению склянок в воду. Хорошим материалом служит фольга, которая плотно облегает склянку и отражает солнечные лучи, что способствует получению более однородных температурных условий в освещенных и затемненных пробах.

5. Фиксированные пробы хранятся не более суток в темноте при низкой температуре, желательно под слоем воды. После растворения осадка следует возможно быстрее провести титрование, избегая попадания света на пробы, чтобы не происходило разрушения иода. Титрование можно ускорить, анализируя все содержимое склянки. При этом повышается и точность измерений за счет увеличения объема титруемой пробы, однако требуется особенная аккуратность в связи с невозможностью повторного анализа.

6. Следует учитывать помехи при йодометрическом определении кислорода, обусловленные составом водной среды — повышенным содержанием органического вещества (при окисляемости более 15 мг O_2 /л), железа (более 1 мг/л), нитритов (более 0,05 мг/л) и других восстановителей или окислителей [1]. В пробах, богатых карбонатами и бикарбонатами, при растворении осадка может происходить вспенивание раствора за счет образования CO_2 и теряться часть содержимого [10].

7. Ошибки могут быть связаны с самой сущностью метода — экспонированием испытуемых проб на свету и в темноте, поскольку дыхание в тех и других условиях различается. Например, в „светлых” склянках оно может стимулироваться увеличением содержания кислорода. Особенно важно это учитывать, когда интенсивность фотосинтеза сравнительно невысокая и не компенсирует расхода дыхания, а разность содержания кислорода в

„светлых” и „темных” склянках определяется фактически его убылью в темноте. Аналогичная ситуация может возникнуть и в продуктивных водах, если велико обилие бактерий и зоопланктона, энергично потребляющих кислород. В таких случаях после экспозиции возможно превышение его содержания в „темных” склянках относительно „светлых”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алекин О. А., Семенов А. Д., Скопинцев Б. А. Руководство по химическому анализу вод суши. Л., 1973.
2. Баславская С. С., Трубецкая О. М. Практикум по физиологии растений. М., 1964.
3. Бульон В. В. Первичная продукция планктона // Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Фитопланктон и его продукция. Л., 1981.
4. Винберг Г. Г. Опыт изучения фотосинтеза и дыхания в водной массе озера. К вопросу о балансе органического вещества. Сообщ. 1 // Тр. Лимнол. ст. в Косине. 1934. Вып. 18.
5. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
6. Пырина И. Л. Первичная продукция фитопланктона // Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М., 1975.
7. Cessner F. Die Photosynthese des Phytoplanktons // Handbuch der Pflanzenphysiologie. Berlin, 1960.
8. Knaute K. Der Kreislauf der Gase in unseren Gewässern // Biol. Zbl. 1989. Bd 18, N 22.
9. Lund J. W. G., Talling J. F. Botanical limnological methods with special reference to the algae // Bot. Rev. 1957. Vol. 23.
10. Mackereith F. J. H., Heron J., Talling J. F. Water analysis: some revised methods for limnologists. Kendal, 1978.
11. Strickland J. D. H., Parsons T. R. A practical handbook of seawater analyses // Bull. Fish. Res. Board. Canada. 1968. Vol. 167.
12. Talling J. F. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters // Freshwater Biol. 1973. Vol. 3, N 4.
13. Vollenweider R. A., Talling J. F., Westlake D. F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments (IBP Handbook N 12). Oxford, 1974.
14. Winkler L. W. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffs // Ber. deutsch. chem. Ges. 1988. Bd 21.

В. В. Бульон

Зоологический институт РАН

РАДИОУГЛЕРОДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ФИТОПЛАНКТОНА, ЕГО ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ В СРАВНЕНИИ С КИСЛОРОДНЫМ МЕТОДОМ

Рассмотрены особенности процедуры измерения фотосинтеза планктона радиоуглеродным методом, обсуждены причины отличия его результатов от полученных кислородным методом.

Радиоуглеродный метод, основанный на регистрации излучения изотопного углерода ^{14}C , ассимилированного в процессе фотосинтеза, почти на два порядка величины чувствительнее кислородного. Метод впервые применен в 1950 г. при определении первичной продукции в океане [21], а в 1953—1954 гг. — в пресных водоемах [9, 16].

Сущность методики сводится к следующему [3, 15, 23]. В пробу воды объемом 100 мл вносится ^{14}C в виде раствора карбоната или гидрокарбоната с известной радиоактивностью. После экспонирования на свету (в течение суток, светового дня или нескольких часов) она фиксируется формалином и отфильтровывается через мембранный фильтр с размером пор от 0,8 до 1,5 мкм. По краю фильтра делается необходимая надпись. Затем с помощью соответствующей аппаратуры определяют радиоактивность планктона, собранного на фильтре, предварительно удалив абсорбированные карбонаты. Для их удаления фильтры в плавающем состоянии помещают на 5 мин в кювету, заполненную 0,5 %-ным раствором HCl , после чего переносят их на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой, чтобы избавиться от избытка кислоты [15]. Скорость фотосинтеза (A , мкг $\text{C}/\text{л}$) за время опыта рассчитывается по формуле:

$$A = (r/R) C,$$

где C — содержание в воде общей углекислоты (мкг С/л); r — радиоактивность, накопленная фитопланктоном за экспозицию; R — радиоактивность, внесенная в пробу.

Рабочий раствор изотопа готовят из фабричного препарата $\text{Na}^{14}_2\text{CO}_3$ или $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ на дистиллированной воде с рН 8,5—9,0. Объем воды для разведения препарата выбирают с учетом экспозиции, обилия фитопланктона и содержания общей CO_2 в воде исследуемого водоема. Например, в олиготрофных озерах с общей минерализацией воды около 200 мг/л и первичной продукцией на оптимальной глубине 20 мкг С/(л · сут) требуется вносить в пробу такой объем рабочего раствора изотопа, радиоактивность которого приближается к 20 мк Ки, или 0,74 МБк. С увеличением минерализации воды или с уменьшением продуктивности водоема вносят большее количество изотопа. Рабочий раствор рекомендуется освобождать от взвешенных частиц фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,2—0,4 мкм. Профильтрованный раствор разливают в ампулы по 2 мл, запаивают и стерилизуют в кипящей водяной бане в течение 1 ч трижды, с суточным интервалом. Радиоактивность рабочего раствора определяют на сцинтилляционном счетчике, используя диоксановую жидкость (например, ЖС-8), совместимую с водной фазой. Для этого на 5 мл сцинтилляционной жидкости достаточно внести 10 мкл проверяемого препарата.

Погрешность определений первичной продукции с помощью радиоуглеродного метода связана в основном с выделением фитопланктоном растворенного органического вещества (прижизненно или при отмирании клеток), а также с механическим разрушением оболочек клеток и потерей их содержимого в процессе фильтрации проб. Ошибка метода закономерно выше для олиготрофных вод, чем для более продуктивных [3]. Таким образом, имеет место парадокс: первичная продукция олиготрофных водоемов может быть оценена только с помощью высокочувствительного радиоуглеродного метода, но именно в олиготрофных водах этот метод оказывается наименее точным.

К настоящему времени разработан ряд модификаций радиоуглеродного метода, которые позволяют учитывать продукцию как взвешенного органического вещества (ВОВ), так и растворенного (РОВ). Продукцию ВОВ, созданную фитопланктоном, измеряют стандартным радиоуглеродным методом с последующим определением радиоактивности РОВ в фильтрате. Чтобы удалить из него меченую углекислоту, не использованную водорослями за экспозицию, на 100 мл фильтрата вносят 2 мл 5 %-ного раствора соды в качестве носителя $^{14}\text{CO}_2$ и несколько капель метилрота, приготовленного на подщелоченной воде. Жидкость подкисляют 5 %-ным раствором H_2SO_4 до появления красной окраски (рН

около 4) и аэрируют 30 мин. После повторного добавления соды и подкисления ее нагревают до кипения. Для предотвращения потерь CO_2 при проведении этих операций фильтрат подщелачивают 2 н раствором КОН до pH 9—10 (до перехода окраски раствора от красной к желтой). Затем переносят в кварцевую пробирку на 100 мл, добавляют 1 мл пергидроля и облучают ультрафиолетом 3 ч (ртутно-кварцевая лампа мощностью 1000 Вт). Образовавшуюся углекислоту отгоняют в 0,05 н раствор КОН с помощью прибора [3], разработанного Ю. И. Сорокиным, и осаждают 10 %-ным раствором BaCl_2 , добавленным в объеме 0,5 мл. Осадок BaCO_3 отфильтровывают на мембранный фильтр с размером пор 0,4 мкм, подсушивают, ссыпают во флакон и заливают сцинтилляционной жидкостью. Радиоактивность осадка просчитывают после интенсивного взмучивания во флаконе, что позволяет избежать самопоглощения бета-частиц. Другая модификация метода оценки растворенной и взвешенной фракции первичного органического вещества основана на дифференциальной фильтрации проб; она рассматривается при обсуждении внескелеточной продукции фитопланктона (см. настоящий сборник, с. 00).

Выяснению границ применимости радиоуглеродного метода помогает сопоставление его с кислородным методом. Однако до сих пор не совсем ясно, как соотносить их показания, которые выражаются в единицах массы разных химических элементов (С и O_2). Взаимопереход между ними осуществляется на основе некоторых допущений. Например, если считать ассимиляционный коэффициент для фитопланктона (АК), равным 1, то 1 мг O_2 эквивалентен 0,375 мг С. Чаще применяется $\text{АК}=1,25$, при этом условии 1 мг O_2 эквивалентен 0,3 мг С. Вопрос о пересчете данных усложняется тем, что с помощью кислородного и радиоуглеродного методов наблюдают не совсем идентичные процессы. Первичный метод позволяет измерять истинную (валовую) первичную продукцию, которая включает траты на дыхание планктона; второй — ту часть ассимилированного углерода, которая вошла в клеточные структуры фитопланктона за время экспозиции с $^{14}\text{CO}_2$. Некоторая доля углерода, включенная в ранние продукты фотосинтеза, быстро возвращается в свое исходное состояние в результате окислительной минерализации и не подлежит учету.

Многочисленные сравнения кислородного и радиоуглеродного методов показывают, что они не дают сходных результатов. По данным В. И. Романенко [12] для водохранилищ Волги и Дона, продукция фитопланктона, полученная радиоуглеродным методом, в среднем в 1,54 раза ниже валовой первичной продукции, измеренной по кислороду (при $\text{АК}=1$), по более поздним данным [13] для Рыбинского водохранилища, — в 1,25 раза.

Имеется ряд объяснений более низких значений скорости фотосинтеза по радиоуглеродному методу по сравнению с кислородным. Некоторая доля ассимилированного ^{14}C минерализуется клетками фитопланктона при их дыхании. При этом за сутки может быть израсходовано от 7 до 20 % ассимилированного ^{14}C [14]. Не исключено, что в процессе окисления меченых продуктов фотосинтеза участвуют гетеротрофные микроорганизмы [25]. Возможны потери и растворимых продуктов фотосинтеза при мембранной фильтрации. Связанный с этим недоучет первичной продукции стандартным изотопным методом закономерно возрастает от эвтрофных к олиготрофным водам [18, 22, 24].

Статистический анализ большего числа параллельных измерений скорости фотосинтеза радиоуглеродным и кислородным методами, выполненных разными исследователями (см. рисунок), позволяет прийти к выводу, что с помощью ^{14}C учитывается в среднем около 75 % валовой первичной продукции:

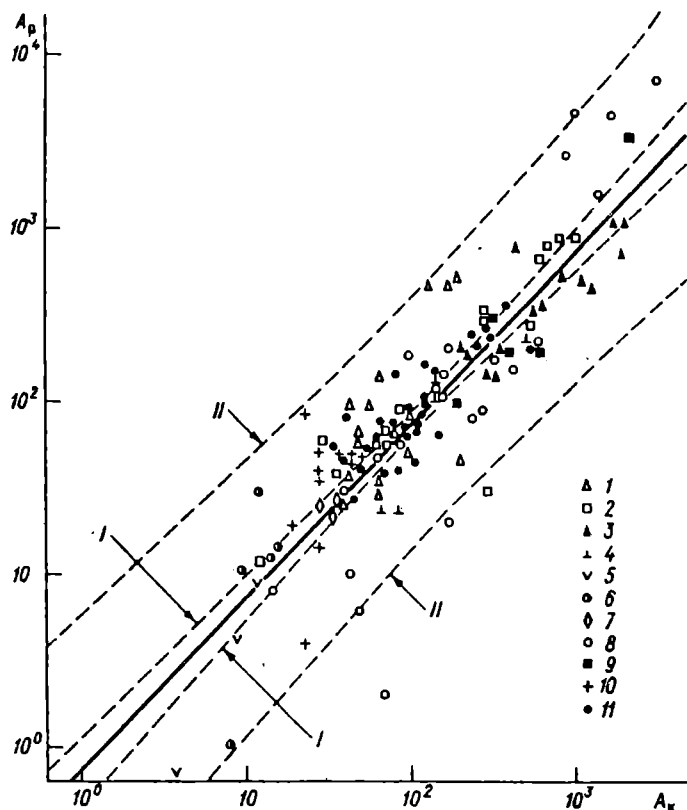
$$\lg A_p = (1,957 \pm 0,57) + (1,003 \pm 0,97) (\lg A_k - 2,083) \text{ или} \\ A_p = 0,47 A_k^{1,003}, (n = 133, r = 0,875), \quad (1)$$

где A_p и A_k — фотосинтез, измеренный по радиоуглероду и кислороду, в мкг С/(л·сут). Для пересчета данных кислородного метода выбран коэффициент перехода 0,3 мг С/мг O_2 , вытекающий из $AK = 1,25$. Полученное уравнение указывает на практически линейный характер связи между A_p и A_k . Близким уравнением аппроксимируется соотношение между A_p и A_k в пределах 50—1000 мкг С/(л·сут) для озер Забайкалья [5]:

$$A_p = 0,73 A_k^{(1,002 \pm 0,204)} (n = 14, r = 0,936). \quad (2)$$

Тем не менее, для отдельных водоемов характерно отклонение от линии регрессии, передаваемой уравнением (1). Так, в экспериментах автора с водой из арктического озера (о. Хейса, Земля Франца-Иосифа), экспонированной в лаборатории в течение 15 ч при освещенности 5000 лк и температуре около 5 °С, отношение A_p/A_k при $AK = 1,25$ составило в среднем 0,58.

По совокупности рассмотренных здесь данных отношение A_p/A_k колеблется от 0,1 до 3,6, наиболее часто — в границах 0,5—1,0. Поэтому его только в первом приближении можно принять равным 0,75 (при $AK = 1,25$). Следует иметь в виду, что величина ассимиляционного коэффициента зависит от многих трудно учитываемых факторов: насыщенности воды кислородом, интенсивности фотореспирации водорослей, химического состава продуктов фотосинтеза и некоторых других [1, 20, 26]. Посту-



Соотношение скоростей фотосинтеза (мкг С/(л·сут)) планктона, измеренных радиоуглеродным (A_p) и кислородным (A_k) методами.

1 — Харбейские озера [11], 2 — озера Белоруссии [6], 3 — волжские водохранилища [12], 4 — оз. Байкал [7], 5 — оз. Севан [8], 6 — субарктические озера (данные автора), 7 — озера Забайкалья [2], 8 — озера и пруды Приладожья [10], 9 — пруды Латвии [17], 10 — зал. Дамбел [19], 11 — озера Монголии [4]; I и II — математическое ожидание средних значений A_p при заданных A_k и доверительный интервал линии регрессии по уравнению (1).

лирование какого-то единственного „универсального” значения A_K может быть одной из причин расхождения результатов двух методов в отдельных определениях и иногда наблюдаемого превышения данных радиоуглеродного метода над показаниями кислородного.

Однако при всех ограничениях радиоуглеродный метод имеет неоспоримое преимущество перед кислородным, благодаря тому что улавливает ничтожно малую скорость фотосинтеза и, таким образом, остается единственным, позволяющим определять первичную продукцию планктона в условиях олиготрофных водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белл Л. Н. Энергетика фотосинтезирующей растительной клетки. М., 1980.
2. Бондарева Е. Н., Шишкин Б. А. Первичная продукция Ивано-рахлейских озер // Зап. Забайкал. фил. Геогр. о-ва СССР. 1972. Вып. 80.
3. Бульон В. В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л., 1983.
4. Бульон В. В. Лимнологические очерки Монголии. Л., 1985.
5. Бульон В. В., Белова М. А., Комаровская Р. Н. Сестон и активность микрофлоры в Еравно-Харгинских озерах // Исследование взаимосвязи ормовой базы и рыбопродуктивности на примере озер Забайкалья. Л., 1986.
6. Винберг Г. Г. Первичная продукция озерного планктона, изученная двумя методами: кислородным, радиоуглеродным и хлорофильным // Тр. УП науч. онф. по изучению внутр. водоемов Прибалтики. М.; Л., 1962.
7. Вотинцев К. К., Глазунов И. В., Мещерякова А. И., Попова Г. И. Первичная продукция фитопланктона // Тр. Лимнол. ин-та ЮАН СССР. 1971. Т. 12, вып. 32.
8. Гамбарян М. Е. Определение интенсивности фотосинтеза и деструкции органического вещества и биотический баланс водной толщи оз. Севан // Радиоактивные изотопы в гидробиологии и методы санитарной гидробиологии. М.; Л., 1964.
9. Кузнецов С. И. Использование радиоактивной углекислоты C^{14} для определения сравнительной величины фотосинтеза в хемосинтезе в ряде озер различных типов // Изотопы в микробиологии. М., 1955.
10. Озерецковская Н. Г., Жарова Т. В., Рождественская Н. В., Мирнова Н. Ф. Сравнительно-методическое изучение первичной продукции водоемов Приладожья // Гидробиол. исследования самоочищения водоемов. Л., 1976.
11. Пырина И. Л., Гецен М. В., Вайнштейн М. Б. Первичная продукция фитопланктона озер Харьейской системы Большеземельской тундры // Продуктивность озер восточной части Большеземельской тундры. Л., 1976.
12. Романенко В. И. Сравнение кислородного и радиоуглеродного методов определения интенсивности фотосинтеза фитопланктона // Микрофлора, фитопланктон и высшая растительность внутренних водоемов. Л., 1967.
13. Романенко В. И. Первичная продукция и бактериальные процессы деструкции органического вещества в Рыбинском водохранилище // продукционно-экологические исследования экосистем пресных вод. Минск, 1973.
14. Романенко В. И., Кудрявцев В. М. Суточная динамика продукции органического вещества фитопланктоном в Рыбинском водохранилище // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1979. № 7.
15. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных вод. Л., 1974.
16. Сорокин Ю. И. О применении радиоактивного углерода C^{14} для изучения первичной продукции водоемов // Тр. Всес. гидробиол. о-ва. 1956. Т. 7.
17. Хмелева Н. Н. Сравнительное определение продукции планктона в водах Латвийской ССР кислородным и радиоуглеродным методами // Первичная продукция морей и внутренних вод. Минск, 1961.

18. Anderson G. C., Zeutschel R. P. Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the Northeast Pacific Ocean // *Limnol., Oceanogr.* 1970. Vol. 15, N 3.
19. Appolonio S. Primary production in Dumbell Bay in the Arctic Ocean // *Mar. Biol.* 1980. Vol. 81, N 1.
20. Burris J. E. Effects of oxygen and inorganic carbon concentrations on the photosynthetic quotients of marine algae // *Mar. Biol.* 1981. Vol. 65, N 3.
21. Steemann Nielsen E. The use of radio-active carbon (^{14}C) for measuring organic production in the sea // *J. Con. Perm. Int. Exp. Mer.* 1952. Vol. 18.
22. Thomas J. P. Release of dissolved organic matter from natural populations of marine phytoplankton // *Mar. Biol.* 1971. Vol. 11, N 4.
23. Vollenweider R. A., Talling J. F., Westlake D. F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook N 12. Oxford, 1974.
24. Watt W. D. Release of dissolved organic matter from the cells of phytoplankton populations // *Proc. Roy. Soc. London, B.* 1966. Vol. 164, N 997.
25. Weibe W. J., Smith D. F. Direct measurement dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs // *Mar. Biol.* 1977. Vol. 42, N 3.
26. Westlake D. F., Adams M. S., Bindloss M. E., e. a. Primary production // *The functioning of freshwater ecosystems.* Cambridge, 1980.

И. Л. Пырина

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН*

ОСОБЕННОСТИ УСЛОВИЙ ДЛЯ ФОТОСИНТЕЗА В ИЗОЛИРОВАННЫХ ПРОБАХ ФИТОПЛАНКТОНА

Обсуждаются возможные отклонения фотосинтеза фитопланктона в экспериментах с изолированными пробами от происходящего в естественной обстановке.

Проблема изолирования испытуемых проб является одной из первостепенных при измерении первичной продукции фитопланктона. Это связано с тем, что его облик и состояние в большой степени определяются факторами среды, в которую он погружен, причем не только физическими и химическими (свет, температура, турбулентность, элементы питания), но и биологическими (действие метаболитов, атака паразитов, выедание). В изолированных образцах воды неизбежны отклонения скорости фотосинтеза от существующей в водоеме, что необходимо учитывать при проведении экспериментов и интерпретации результатов. Однако именно этот подход позволяет оценить скорость процесса в единице объема воды за определенный отрезок времени, поэтому он получил наиболее широкое распространение.

Классическим приспособлением для изолирования проб воды с фитопланктоном являются склянки с притертыми пробками. Однако стекло поглощает часть света, особенно ультрафиолетового, из-за чего световые условия в склянках несколько отличаются от естественных [11]. Это может иметь значение для проб, экспонируемых в верхних горизонтах, куда проникают ультрафиолетовые лучи. Ультрафиолет частично пропускается кварцевым стеклом, но использование такой посуды ограничено ее высокой стоимостью. Экспериментальные сосуды можно изготавливать из плексигласа, близкого по оптическим свойствам к кварцу. При этом необходимо следить, чтобы сосуды сохраняли прозрачность (в них нельзя фиксировать кислород при йодометрическом определении, для чего порцию воды следует отливать с помощью шпона в отдельную склянку).

В замкнутом объеме склянок могут измениться условия снабжения клеток питательными веществами и отток метаболитов, особенно при высокой биомассе фитопланктона. Так, показано ограничение фотосинтеза недостатком биогенных элементов в культурах водорослей при численности более 7 млрд.кл /л для крупных видов и 20 млрд.кл /л — для мелких [1]. При интенсивном фотосинтезе возможно ингибирующее действие кислорода, накапливающегося в пробе [7]. В присутствии большого количества зоопланктона отмечена убыль фитопланктона (хлорофилла) за счет выедания [6], масштабы которого в склянках могут быть иными по сравнению с водоемом.

При экспонировании склянок на той же глубине водоема, где были взяты пробы (измерения *in situ*), достаточно хорошо соблюдаются температурные и световые условия обитания фитопланктона, но нарушается турбулентность. Ее ослабление приводит к оседанию или всплыванию водорослей в склянке, что отражается на их функциональной активности. Отсутствие вертикальных перемещений фитопланктона при его экспонировании на фиксированных горизонтах нарушает идентичность между условиями в эксперименте и в водоеме. Чтобы преодолеть это несоответствие, предлагаются оригинальные приспособления для перемешивания воды в склянке и для перемещения склянок с пробами в пределах эвфотной зоны [8, 9].

Многие неблагоприятные явления, связанные с заключением воды в склянки, становятся более заметными при длительной экспозиции. В целом ряде работ отмечено уменьшение скорости фотосинтеза в экспериментах, продолжающихся более 4—6 ч, особенно при использовании радиоуглеродного метода [11]. Замедление фотосинтеза в течение экспозиции сильнее выражено при интенсивном освещении и повышенной концентрации фитопланктона (хлорофилла), т. е. в условиях, изначально обеспечивающих высокую скорость процесса. При умеренном освещении, а также в пробах со сравнительно небольшим количеством водорослей не наблюдается снижение скорости выделения кислорода за сутки по сравнению с более короткой экспозицией [2].

Чтобы избежать возможное занижение первичной продукции фитопланктона, применяется краткосрочное экспонирование. Однако в этом случае страдает другая сторона эксперимента, связанная с различным характером изменений световых условий за время экспозиции и за сутки. Следует отметить, что с экологической точки зрения сутки, включающие световой и темновой периоды, являются наиболее подходящей единицей времени для характеристики скорости процесса в природной обстановке. Поэтому, несмотря на физиологические преимущества опытов с короткой экспозицией, последние не вполне годятся для оценки первичной продукции в водоеме. Их результаты приходится пересчитывать на сутки с помощью эмпирически найденных соот-

ношений между величинами фотосинтеза за краткосрочную и точную экспозицию [5] или по ходу солнечной радиации в течение этих периодов [10]. В том и другом случае делаются допущения, основанные на строгом соблюдении условий эксперимента и расчетов, без чего трудно получить адекватные данные.

В работах по определению первичной продукции фитопланктона на больших акваториях проведение опытов *in situ* невозможно, так как для этого требуется длительная стоянка судна. В таких случаях склянки экспонируют в разного рода инкубаторах [3, 11]. При этом экспериментально определяют максимальный фотосинтез в области светового насыщения [4] или несколько его значений для разных уровней энергетической освещенности, а интенсивность этого процесса в водоеме находят расчетным путем с помощью дополнительных вычислений. В таких экспериментах можно поддерживать близкой к естественной лишь температуру (прокачиванием заборной воды или электротерморегулятором), световые условия водоема воспроизвести трудно. Однако если учитывать энергетическую освещенность и световые зависимости подводного фотосинтеза, а также пользоваться адекватной моделью расчетов, можно добиться достаточно хорошего совпадения результатов с получаемыми *in situ*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баславская С. С., Трубецкова О. М. Практикум по физиологии растений. М., 1964.
2. Минеева Н. М. Фотосинтез фитопланктона Рыбинского водохранилища при различном времени экспонирования проб // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1990. № 87.
3. Пырина И. Л. Первичная продукция фитопланктона // Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М., 1975.
4. Пырина И. Л. Определение первичной продукции фитопланктона по максимальному фотосинтезу, суммарной солнечной радиации и прозрачность воды // Гидробиол. журн. 1979. Т. 15, № 6.
5. Романенко В. И. Величины суточного и кратковременного фотосинтеза при определении с помощью C^{14} // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1970. № 5.
6. Сигарева Л. Е. Некоторые данные об изменениях концентраций пигментов фитопланктона и pH среды в склянках при измерении фотосинтеза // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1980. № 46.
7. Сиренко Л. А. Влияние кислорода на микроорганизмы и растения // Искусственная аэрация природных вод. Киев, 1982.
8. Behrendt H. Devices for turbulence simulation during *in situ* measurements of biological processes in aquatic ecosystems. I. A simple stirrer for bottles of different volume // Acta hydrophys. 1989. Bd 33, N 1.
9. Behrendt H. Devices for turbulence simulation during *in situ* measurements of biological processes in aquatic ecosystems. II. A bottle lift for simulations of vertical movements in natural waters // Acta hydrophys. 1989. Bd 33, N 1.

10. Talling J. F. The photosynthetic activity of phytoplankton in East African lakes // Int. Revue ges. Hydrobiol. 1965. Vol. 50, N 1.

11. Vollenweider R. A., Talling J. F., Westlake D. F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook N 12. Oxford, 1974..

В. М. Гольд, В. А. Попельницкий

*Красноярский университет***ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕЗА ФИТОПЛАНКТОНА
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ**

Обсуждаются сущность и особенности процедуры определения интенсивности фотосинтеза фитопланктона флуоресцентным методом.

Флуоресцентный метод определения фотосинтеза базируется на существовании тесной зависимости между скоростью выделения кислорода или фиксации углекислоты и долей поглощенной световой энергии, пошедшей на первичные фотохимические реакции. Доля этой энергии находится по амплитуде увеличения интенсивности свечения хлорофилла — так называемой вариабельной флуоресценции ($\Delta \Phi$), которое происходит при блокировании электронно-транспортной цепи фотосинтетического переноса электронов (ЭТЦ) специфическими ингибиторами (диурон, моноурон, симазин) или при индукционных переходах темнота—свет. Такая зависимость доказана экспериментально и зафиксирована как на высших, так и низших растениях [7]. Ее теоретическое обоснование связано с общими представлениями о том, что вариабельная флуоресценция отражает степень использования энергии света в фотохимических реакциях фотосинтеза, сопряженных с выделением кислорода.

Возможность использования флуоресцентных свойств клетки для определения интенсивности фотосинтеза водорослей продемонстрирована на альгологически чистых культурах [1, 6, 8—10]. Однако попытки применить этот метод к природным альгоценозам не дали положительных результатов. Основными причинами оказались гетерогенность структуры популяций водорослей и таксономическая специфичность коэффициента связи вариабельной флуоресценции со скоростью выделения кислорода [4—6]. Коэффициенты линейной регрессии этой связи, полученные в опытах с представителями сине-зеленых, диатомовых и зеленых водорослей, достоверно различаются (для уровней значимости, не превосходящих 0,1):

<i>Anabaena variabilis</i>	0,000130, $r = 0,964$
<i>Nitzschia palea</i>	0,000034, $r = 0,850$
<i>Chlamydomonas</i> sp.	0,000054, $r = 0,997$
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,000015, $r = 0,880$

Для смеси водорослей интенсивность фотосинтеза может быть определена как

$$\Delta O_2 / \Delta t = \sum b_i \Delta \Phi_i, \quad (1)$$

где $\Delta \Phi_i$ — величина варибельной флуоресценции i -го вида водорослей, b_i — коэффициент линейной регрессии, показывающий связь $\Delta \Phi_i$ со скоростью выделения кислорода ($\Delta O_2 / \Delta t$).

Однако практическое использование формулы (1) для оценки фотосинтеза природного сообщества водорослей осложнено трудностями определения конкретных b и $\Delta \Phi$ отдельных видов. Исключения составляют лишь случаи доминирования одного вида, например, при „цветении” воды.

Таксономические различия коэффициента пропорциональности (b_i) становятся несущественными, если величину $\Delta \Phi$ предварительно пронормировать по показателю удельного выхода флуоресценции K , полученному при фиксированной интенсивности возбуждающего света.

При этом

$$K = \Phi_m / C_a,$$

где Φ_m — интенсивность флуоресценции фитопланктона в присутствии ингибитора (симазин, диурон), C_a — концентрация хлорофилла „а” в пробе.

После нормирования и некоторых упрощений [2, 4], позволяющих базироваться на реально измеряемых параметрах, уравнение связи интенсивности фотосинтеза с показателями флуоресценции приобретает вид

$$\Delta O_2 / \Delta t = B C_a \Delta \Phi / \Phi_m. \quad (3)$$

Коэффициент B зависит от конструктивных особенностей флуориметра и устанавливается экспериментально при его калибровке [2].

Для приближения световых условий эксперимента к естественным при возбуждении флуоресценции используется излучение широкого спектрального диапазона (400—620 нм). При этом регистрируемую прибором величину $\Delta \Phi$ необходимо привести в соответствие с интенсивностью света на том горизонте, с которого

была взята проба фитопланктона. Поскольку трудно воссоздать натурные световые условия в кюветном отделении флуориметра, можно ограничиться определениями зависимости параметров $\Delta\Phi$ или $\Delta\Phi/\Phi_m$ от интенсивности возбуждающего света, меняя величину последней с помощью нейтральных светофильтров. По характеру полученной зависимости интерполяций или экстраполяций определяют искомое значение $\Delta\Phi$ или $\Delta\Phi/\Phi_m$ для освещенности на уровне конкретного горизонта отбора пробы. При этом для расчета скорости фотосинтеза можно использовать уравнение (3) с условием, что величина Φ_m должна быть измерена при той же интенсивности света, которая была использована ранее при получении градуировочной характеристики прибора (переход от коэффициента b_i в уравнении (1) к коэффициенту B в уравнении (3)). Если оперируют величиной $\Delta\Phi/\Phi_m$, то в уравнение (3) вводят дополнительный множитель M , равный отношению интенсивности света на заданной глубине к его интенсивности при калибровке, посредством чего удельный выход флуоресценции приводится к условиям измерения градуировочной характеристики прибора:

$$\Delta O_2/\Delta t = BC_a M \Delta\Phi/\Phi_m. \quad (4)$$

Величины $\Delta\Phi$ или $\Delta\Phi/\Phi_m$, полученные при построении световых кривых, характеризуют удельную фотосинтетическую и общую физиологическую активность водорослей и могут использоваться в качестве самостоятельного показателя их состояния, в частности при биоиндикации и биотестирования качества воды.

Таким образом, процедура определения интенсивности фотосинтеза фитопланктона флуоресцентным методом сводится к следующему.

1. Отбирают пробы с необходимых горизонтов при одновременном измерении на них энергетической освещенности I (последняя может быть рассчитана по I_0 на поверхности).

2. После 20-минутной темновой экспозиции определяют характер световой зависимости стационарного уровня флуоресценции путем последовательного повышения интенсивности возбуждающего света с использованием широкополосного светофильтра, пропускающего излучение с длинами волн до 620 нм.

3. В кювету вводят раствор ингибитора ЭТЦ фотосинтеза (диурон, симазин, до конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М) и определяют характер световой зависимости максимального уровня флуоресценции.

4. При тех же световых условиях определяют уровень флуоресценции фильтрата пробы для поправки на фоновую флуоресценцию.

5. На основании результатов операций 2—4 получают истинное (без фона) значение отношения $\Delta\Phi/\Phi_m$, адекватное уровню освещенности на горизонте отбора пробы, которое и берут для дальнейших расчетов согласно уравнению (4). Для простоты расчетов значение I_0 , используемое при калибровке прибора, целесообразно ввести в коэффициент B .

Концентрация хлорофилла может быть определена спектрофотометрическим или флуоресцентным методом [2]. В последнем случае сокращается время анализа пробы. При полной флуоресцентной диагностике пробы фитопланктона (определение интенсивности фотосинтеза, общего содержания хлорофилла „а” и его распределения по основным отделам водорослей) время анализа составляет 10—15 мин. Более подробные методические рекомендации приведены в специальной работе [2]. При определении интегральной первичной продукции под 1 м² процедуру повторяют для проб с нескольких горизонтов эвфотной зоны, затем проводят соответствующие расчеты [2, 5].

Объективность метода проверена экспериментально на смесях альгологически чистых культур сине-зеленых, диатомовых и зеленых водорослей [4], а также на природном фитопланктоне [3]. Результаты показали, что при непродолжительном экспонировании проб (1—4 ч) в условиях сравнительно невысокой облученности (до 230 Вт/м² ФАР) наблюдается хорошее совпадение скорости выделения кислорода, полученной прямыми измерениями и рассчитанной по флуоресценции: коэффициенты линейной регрессии связи между теми и другими данными составляют около 1, коэффициенты корреляции — от 0,8 до 0,47. С увеличением времени экспозиции расхождение результатов различных методов возрастает, особенно для проб с большим содержанием водорослей (хлорофилла). При высокой концентрации хлорофилла степень этих различий зависит и от интенсивности света. Очевидно это является следствием реализации „склянного эффекта”, возникающего при длительном экспонировании проб в замкнутых объемах. Подтверждением служат результаты измерения вариабельной флуоресценции, которые в склянках с высоким содержанием хлорофилла после экспонирования при интенсивном освещении показали снижение и даже полное ингибирование фотосинтеза, тогда как в водоеме на глубинах отбора испытуемых проб за этот период они практически не менялись.

Флуоресцентный метод обладает неоспоримым преимуществом, позволяющим определять фотосинтез фитопланктона без экспонирования испытуемых проб в замкнутом объеме экспериментальных сосудов. Высокая чувствительность метода делает возможным

его применение для оценки продуктивности олиготрофных вод. Показатели флуоресценции, на основании которых определяется интенсивность фотосинтеза, служат источником дополнительной информации о физиологическом состоянии водорослей. Недостатком метода является использование в качестве ингибиторов ЭТЦ стойких гербицидов, к которым относятся симазин, моноурон, диурон. Они могут быть исключены, если оценивать переменную флуоресценцию по ее индукционному переходу в условиях „темнота—свет“. Однако этот способ слабо изучен и не приемлем для всех водорослей, в частности для сине-зеленых, у которых индукционные переходы слабо выражены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калчев Р. К., Кочубей С. М., Гродзинский Д. М. Связь между флуоресценцией хлорофилла *in vivo* и продуктивностью синезеленой водоросли *Anabaena variabilis* // Гидробиол. журн. 1983. Т. 48, № 3.
2. Методические рекомендации по дистанционным методам контроля качества поверхностных вод суши. Вып. 3. Экспрессное флуориметрическое определение концентрации хлорофилла „а“ и фотосинтетической активности фитопланктона. Л., 1989.
3. Минеева Н. М., Попельницкий В. А. Определение фотосинтеза фитопланктона Рыбинского водохранилища флуоресцентным и кислородными методами // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1990. № 88.
4. Попельницкий В. А., Гаевский Н. А., Гольд В. М., Белоног Н. П. Переменная флуоресценция и фотосинтетическая активность смешанных культур водорослей (алгоритмы расчета) // Красноярский ун-т. 1986. 12 с. Деп. в ВИНТИ. 25.06.86, № 4657—В 86.
5. Попельницкий В. А., Гаевский Н. А., Гольд З. Г. Использование флуоресценции для определения первичной продукции фитопланктона // Красноярский ун-т. 1987. 8 с. Деп. в ВИНТИ. 21.05.87, № 3650—В 87.
6. Попельницкий В. А., Шатров И. Ю., Гаевский Н. А., Гольд В. М. Переменная флуоресценция хлорофилла „а“ как показатель фотосинтетической активности водорослей // Комплексные исследования экосистемы бассейна реки Енисей. Красноярск. 1985.
7. Kulandaivelu G., Daniel H. Dichlorophenyl dimethylurea (DCMU) induced increase in chlorophyll „a“ fluorescence intensity — an index of photosynthetic oxygen evolution in leaves, chloroplasts and algae // *Physiol. Plant.* 1980. Vol. 48, N 3.
8. Neveux J., Jupin H. Une approche vers l'estimation de la production potentiellement du phytoplancton par analyse des cinétiques d'induction de fluorescence // *Mar. Biol.* 1981. Vol. 63, N 1.
9. Öquist G., Hagström A., Samuelsson G., Alm P., Richardson K. Chlorophyll „a“ fluorescence, an alternative method for estimating primary production // *Mar. Biol.* 1982. Vol. 68, N 1.
10. Samuelsson G., Öquist G. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on „in vivo“ chlorophyll fluorescence // *Physiol. Plant.* 1977. Vol. 40, N 2.

И. Л. Пырина, М. М. Сметанин

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН***РАСЧЕТ ИНТЕГРАЛЬНЫХ И СРЕДНИХ ВЕЛИЧИН
ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ И ОЦЕНКА ИХ ТОЧНОСТИ**

Обсуждается методика математической обработки результатов определения первичной продукции планктона с оценкой погрешностей за счет измерения и осреднения. Приведены алгоритмы расчетов.

Первичная продукция планктона под 1 м² поверхности водоема может быть получена суммированием ее величин для слоев воды, заключенных между глубинами экспонирования проб. В объеме каждого слоя величину продукции определяют по средней интенсивности фотосинтеза вычислительной на основании результатов измерений на граничных горизонтах. Это наиболее простой и удобный для компьютерной обработки данных способ расчетов, который рекомендуется в целом ряде методических руководств [1, 3, 9].

Если вычисляют первичную продукцию для отдельной станции, т. е. вертикального столба воды сечением 1 м², объемы слоев воды численно равны их толщине, значения которой фактически и используют в расчетах:

$$\int_{z_1}^{z_n} A \, dZ = A(t) \approx \left(\frac{a(Z_1) + a(Z_2)}{2} \right) l_1 + \left(\frac{a(Z_2) + a(Z_3)}{2} \right) l_2 + \dots + \left(\frac{a(Z_{n-1}) + a(Z_n)}{2} \right) l_{n-1}, \quad (1)$$

где $A(t)$ — первичная продукция под 1 м² на момент времени t , $a(Z_1)$, $a(Z_2)$... $a(Z_n)$ — интенсивность фотосинтеза на отдельных глубинах, l_1 , l_2 ... l_{n-1} — толщина слоев воды между

ними: $l_1 = Z_2 - Z_1$, $l_2 = Z_3 - Z_2 \dots l_{n-1} = Z_n - Z_{n-1}$ (число слоев на 1 меньше числа глубин).

Если по результатам измерений на одной станции определять первичную продукцию целого водоема, необходимо использовать конкретные значения объемов исследованных слоев воды в нем:

$$\int_{z_1}^{z_n} A \, dZ = \approx \left(\frac{a(Z_1) + a(Z_2)}{2} \right) V_1 + \left(\frac{a(Z_2) + a(Z_3)}{2} \right) V_2 + \dots + \left(\frac{a(Z_{n-1}) + a(Z_n)}{2} \right) V_{n-1}, \quad (2)$$

где V_1, V_2, \dots, V_{n-1} — объемы слоев, число которых на 1 меньше числа горизонтов измерений. Это связано с тем, что в естественных водоемах с котловинами неправильной формы неодинаковы площади под изобатами на разных глубинах, поэтому объемы ограниченных ими слоев воды непропорциональны толщине. Например, за счет мелководной зоны с глубинами до 1 м объем верхнего 1-метрового слоя обычно меньше нижележащего, равного по толщине, но может быть и больше, если такие мелководья занимают большое пространство. Объемы отдельных слоев воды находят при уровне водоема в момент наблюдений на основании полученной для него зависимости объема водной массы от глубины. Можно использовать значения объема слоев водоема при нормальном уровне, если его колебания в течение периода исследований невелики.

При определении первичной продукции по результатам измерений на нескольких станциях усреднение рекомендуется начинать с данных, относящихся к отдельным слоям, а не к целому столбу воды под 1 м². Это тоже диктуется необходимостью учета вклада различающихся по объему и интенсивности фотосинтеза частей водной массы водоема в общую величину создаваемой в нем первичной продукции фитопланктона. Таким образом, сначала следует получить среднюю интенсивность фотосинтеза на отдельных горизонтах $\bar{a}(Z)$ для различных станций:

$$\bar{a}(Z) = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}, \quad (3)$$

а затем определять его суммарную продукцию в объеме каждого слоя и в целом водоеме:

$$\int_{z_1}^{z_n} A \, dZ = A(t) \approx \left(\frac{\bar{a}(Z_1) + \bar{a}(Z_2)}{2} \right) V_1 + \left(\frac{\bar{a}(Z_2) + \bar{a}(Z_3)}{2} \right) V_2 + \dots + \left(\frac{\bar{a}(Z_{n-1}) + \bar{a}(Z_n)}{2} \right) V_{n-1}. \quad (4)$$

При делении величины $A(t)$ на площадь всей акватории находят среднюю для водоема первичную продукцию в расчете на 1 м^2 в момент времени t :

$$\bar{A}(t) = \frac{1}{S} \left(\frac{a(Z_1) + a(Z_2)}{2} \right) V_1 + \left(\frac{a(Z_2) + a(Z_3)}{2} \right) V_2 + \dots + \left(\frac{a(Z_{n-1}) + a(Z_n)}{2} \right) V_{n-1}. \quad (5)$$

Полученная величина $A(t)$ соответствует взвешенной средней арифметической, в которой учитывается вклад различных по размеру и интенсивности фотосинтеза частей водной массы.

Практические трудности возникают при определении нижней границы фотосинтезирующей зоны, от толщины которой зависит величина первичной продукции в целом столбе воды. Можно ограничивать ее глубиной проникновения солнечной радиации ($0,5 \text{ Вт/м}^2$ или $0,02 \text{ МДж/(м}^2 \cdot \text{сут)}$) для доходящего сюда излучения центральной области спектра), при которой интенсивность фотосинтеза составляет не более 1 % максимальной по вертикальному профилю [5]. Эта глубина может быть найдена расчетным путем, если имеются данные о поступающей в водоем энергии радиации и прозрачности воды [4].

В некоторых работах интегральную величину первичной продукции под 1 м^2 определяют графически — измерением площади, очерченной кривой вертикального профиля фотосинтеза и осями координат [7]. При этом полнее улавливаются плавные изменения фотосинтеза по глубине, но снижается точность получения данных для целого водоема, поскольку не учитывается вклад отдельных слоев воды. Кроме того, этот метод довольно трудоемкий.

Для больших водоемов, расчлененных на участки с достаточно изолированными водными массами, сначала находят, согласно формулам (3), (4), величину первичной продукции отдельных участков, затем, суммированием полученных величин, — в целом водоеме. Делением последней на площадь всего водоема определяют среднюю для него величину первичной продукции в расчете на 1 м^2 на данный момент времени:

$$A(t) = A_1 + A_2 + \dots + A_n, \quad (6)$$

$$A(t) = \frac{1}{S} (A_1 + A_2 + \dots + A_n). \quad (7)$$

Первичную продукцию фитопланктона за определенный отрезок времени (сезон, вегетационный период, год) также можно определить суммированием ее величин, полученных в отдельные периоды наблюдений (T), каждую из которых вычисляют как среднюю арифметическую для измеренных на начальную и конечную дату периода:

$$\int_{t_1}^{t_n} A(t) dt = A \approx \left(\frac{A(t_1) + A(t_2)}{2} \right) T_1 + \left(\frac{A(t_2) + A(t_3)}{2} \right) T_2 + \dots + \left(\frac{A(t_{n-1}) + A(t_n)}{2} \right) T_{n-1}, \quad (8)$$

где $A(t_1), A(t_2) \dots A(t_n)$ — продукция фотосинтеза под 1 м² в момент времени $t_1, t_2 \dots t_n$, $T_1 = t_2 - t_1, T_2 = t_3 - t_2, \dots, T_{n-1} = t_n - t_{n-1}$ (число периодов на 1 меньше дат наблюдений). При делении на общее число суток исследуемого периода находят среднесуточную за этот период величину первичной продукции водоема в целом:

$$\bar{A} = \frac{1}{t_n - t_1} \left[\left(\frac{A(t_1) + A(t_2)}{2} \right) T_1 + \left(\frac{A(t_2) + A(t_3)}{2} \right) T_2 + \dots + \left(\frac{A(t_{n-1}) + A(t_n)}{2} \right) T_{n-1} \right]. \quad (9)$$

Суммарные и средние за вегетационный сезон величины первичной продукции, часто приравняемые к годовым, представляют особенно большой интерес, поскольку по ним судят об уровне продуктивности водоема, на них базируются в балансовых, экосистемных и других продукционно-биологических исследованиях. Практические трудности определения этих величин связаны с необходимостью охватить наблюдениями основные стадии вегетационного цикла фитопланктона — пики и минимумы, начало и конец вегетации. В замерзающих водоемах, не подверженных зимнему „цветению“, вегетационный период по своей продолжительности может быть приравнен к безледному, в начале и конце которого можно приближенно считать продукцию фотосинтеза

равной нулю. При этом необходимо иметь сведения о датах вскрытия и замерзания водоема.

Суммарная за безледный период первичная продукция соответствует созданной фитопланктоном за год. В то же время средняя за сутки этого периода ее величина не может рассматриваться в качестве суточной среднегодовой, поскольку для определения последней необходимо вводить в расчет общее число суток в году. Подобные расчеты редко делаются для замерзающих водоемов, хотя получаемые именно таким путем среднегодовые данные наиболее сравнимы и пригодны для характеристики разных водоемов в отдельные годы. Чаше за годовую и среднегодовую величину первичной продукции фитопланктона принимают вычисленную для конкретного периода наблюдений, что приводит к завышенным оценкам. В этом случае особенно важно указывать сроки, для которых выполнен расчет.

Поскольку интегральные и средние величины первичной продукции устанавливают не прямыми измерениями, а в результате выполненных на их основе последующих вычислений, использование классических методов оценки ошибки репрезентативности полученных данных затруднено. Ошибку находят более сложным способом: по методу оценки косвенных погрешностей. При этом изучаемую характеристику рассматривают как функцию нескольких переменных, точность которых определена предварительно [2, 6]. Таким способом можно оценивать погрешности определения величин, которые находят по другим связанным с ними параметрами с помощью соответствующих уравнений и уже имеют некоторую погрешность. При этом,

если $x = n (x_1 + x_2)$ или $x = n (x_1 - x_2)$,

$$\text{ошибка } \Delta x = n \sqrt{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2}; \quad (10)$$

если $x = n (x_1 \cdot x_2)$ или $x = n \frac{x_1}{x_2}$,

$$\text{то } \Delta x = nx \sqrt{\left(\frac{\Delta x_1}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta x_2}{x_2}\right)^2}; \quad (11)$$

$$\text{если } x = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + \dots + \bar{x}_n}{n}, \text{ то } \Delta x = \sqrt{(\Delta x)_1^2 + (\Delta x)_2^2 + \dots + (\Delta x)_n^2}, \quad (12)$$

$$\text{где } (\Delta x)_1 = \frac{\sigma x}{\sqrt{n}}, \quad (\Delta x)_2 = \frac{1}{n} \sqrt{(\Delta x_1)^2 + (\Delta \bar{x}_2)^2 + \dots + (\Delta x_n)^2},$$

σ — среднеквадратическое отклонение.

Вычислительную процедуру, используемую в этих формулах, называют квадратичным сложением. Оно характерно тем, что преимущественное влияние на итоговую величину оказывают наибольшие слагаемые. Так, для суммы двух квадратично-сложенных величин

$$C = a + b, \text{ ошибка } \Delta C = \sqrt{(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}.$$

Если $\Delta a = 0,5$, $\Delta b = 0,2$, то $\Delta C = 0,54$. Из этого следует, что маленькая ошибка играет небольшую роль и при необходимости повысить точность исследований в первую очередь нужно уменьшать ту ошибку, которая больше остальных [8].

Для примера можно рассмотреть оценку погрешности определения первичной продукции по данным кислородного метода. Погрешность йодометрического определения кислорода (мг/л) с расчетом по формуле:

$$O_2 = \frac{8 N V \cdot 1000n}{(V - V_1) V_2} \quad (13)$$

(где 8 — количество кислорода (мг), соответствующее 1 мл н раствора тиосульфата, N — титр раствора, n — его количество (мл), пошедшее на титрование, V — объем склянки (мл), V_1 — объем добавленных в нее реактивов для фиксации кислорода (мл), V_2 — объем титруемой порции пробы (мл)) в общем иде равна:

$$O_2 = \frac{8 N V \cdot 1000n}{(V - V_1) V_2}$$

$$\sqrt{\left(\frac{\Delta N}{N}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V}{V}\right)^2 + \frac{\Delta V^2 + \Delta V_1^2}{(V - V_1)^2} + \left(\frac{\Delta V_2}{V_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta n}{n}\right)^2}. \quad (14)$$

При постоянных или мало меняющихся для большой серии проб значениях N , V , V_1 , V_2 их погрешности достаточно малы и могут не учитываться. Тогда погрешность измерения кислорода определяется точностью титрования $\frac{\Delta n}{n}$ и при типичных характеристиках посуды и раствора тиосульфата ($N \approx 0,01$, $\approx 150 \pm 0,1$ мл, $V_1 \approx 2 \pm 0,1$ мл, $V_2 \approx 50 \pm 0,1$ мл, $\approx 10 \pm 0,01$ мл) составит, согласно формуле (14), 0,016 мг O_2 /л. Такого порядка погрешность не существенна при оценке концен-

траций кислорода в воде (5—10 мг O_2 /л), однако она значима для фотосинтеза, определяемого по их разности в „светлых” и „темных” склянках, величина которой бывает в пределах нескольких десятых миллиграммов O_2 в 1 л. Это можно видеть на примере расчета фотосинтеза (а) по данным „светлых” (с) и „темных” (т) склянок, экспонированных на крайних глубинах эвфотной зоны (оз. Плещеево, май):

Склянка	$O_2 = \Delta O_2$, мг/л	$\bar{O}_2 \pm \Delta O_2$, мг/л	$a \pm \Delta a (\bar{c} - \bar{m})$, мг O_2 /(л · сут)
Поверхность воды			
Светлая	$12,78 \pm 0,02$	$\bar{c} \ 12,79 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,08$
	$12,80 \pm 0,02$		
Темная	$11,91 \pm 0,02$	$\bar{t} \ 11,97 \pm 0,07$	
	$12,03 \pm 0,02$		
Глубина 4,5 м			
Светлая	$12,21 \pm 0,02$	$\bar{c} \ 12,95 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,08$
	$12,29 \pm 0,02$		
Темная	$12,09 \pm 0,02$	$\bar{t} \ 12,05 \pm 0,0$	
	$12,01 \pm 0,02$		

(ΔO_2 , ΔO_2 , Δa находят по формулам (14), (12), (10) соответственно). В данном случае ошибка репрезентативности определения фотосинтеза в поверхностном горизонте составляет менее 10 %, а в нижнем — 40 %. Поскольку погрешности сильно варьируют в зависимости от вариабельности содержания кислорода в „светлых” и „темных” склянках после экспозиции, невозможно заранее определить точность измерения фотосинтеза, которой можно было бы придерживаться. Поэтому погрешности необходимо оценивать для каждой конкретной серии проб.

При оценке погрешности определения интегральной величины продукции фотосинтеза в столбе воды по 1 м² отдельной точки водоема используемую в расчетах формулу (1) преобразуют:

$$\int_{z_1}^{z_n} A \, dz = A(t) \approx \frac{1}{2} [a(Z_1) l_1 + a(Z_2) (l_1 + l_2) + \dots + a(Z_n) l_{n-1}] \quad (15)$$

Это делается для удобства вычисления общей погрешности [4], определяемой точностью оценки величины фотосинтеза и сравнительно мало зависящей от точности измерения расстояния между исследуемыми глубинами. Оно измеряется со сравнительно

небольшой ошибкой, которую можно не учитывать. В таком случае погрешность величины $A(t)$ находят по формуле

$$\Delta A(t) = \frac{1}{2} \sqrt{[l_1 \Delta a(Z_1)]^2 + [(l_1 + l_2) \Delta a(Z_2)]^2 + \dots + [l_{n-1} \Delta a(Z_n)]^2}. \quad (16)$$

Вычисление величины первичной продукции целого водоема по результатам измерений на нескольких станциях начинают, как отмечено выше, с осреднения полученных для одинаковых глубин данных, уже имеющих некоторую погрешность. При оценке погрешностей этой средней для заданных глубин интенсивности фотосинтеза $\bar{a}(Z)$ учитывают, согласно выражению (12), две составляющие, одна из которых обусловлена вариабельностью данных разных станций $(\Delta x)_1$, другая — точностью их измерения на отдельных станциях $(\Delta x)_2$. Таким образом, если

$$\bar{a}(Z) = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}, \quad (3)$$

$$\Delta \bar{a}(Z) = \sqrt{[\Delta \bar{a}(Z)]_1^2 + [\Delta \bar{a}(Z)]_2^2}, \quad (17)$$

$$\text{где } [\Delta \bar{a}(Z)]_1 = \frac{\sigma \bar{a}(Z)}{\sqrt{n}},$$

$$[\Delta \bar{a}(Z)]_2 = \frac{1}{n} \sqrt{(\Delta a_1)^2 + (\Delta a_2)^2 + \dots + (\Delta a_n)^2}.$$

Интегральную величину первичной продукции всего водоема в случае вычисления погрешностей находят с помощью преобразованной формулы (4):

$$\int_{z_1}^{z_n} A dZ = A(t) \approx [\bar{a}(Z_1) V_1 + \bar{a}(Z_2) (V_1 + V_2) + \dots + \bar{a}(Z_n) V_{n-1}]. \quad (18)$$

Ошибка репрезентативности этой величины равна

$$\Delta A(t) = \frac{1}{2} \sqrt{[V_1 \Delta \bar{a}(Z_1)]^2 + [(V_1 + V_2) \Delta \bar{a}(Z_2)]^2 + \dots + [V_{n-1} \Delta \bar{a}(Z_n)]^2}. \quad (19)$$

При этом допускается, что объемы слоев воды определяют с достаточно малой ошибкой.

Среднюю величину первичной продукции, приходящуюся на единицу площади водоема в данный момент времени (t), находят делением $A(t)$ на площадь акваторий (S):

$$A(t) = \frac{1}{2S} [\bar{a}(Z_1)V_1 + \bar{a}(Z_2)(V_1 + V_2) + \dots + \bar{a}(Z_n)V_{n-1}]. \quad (20)$$

Ее ошибка равна

$$\Delta A(t) = \frac{1}{2S} \sqrt{[V_1 \Delta \bar{a}(Z_1)]^2 + [(V_1 + V_2) \Delta \bar{a}(Z_2)]^2 + \dots + [V_{n-1} \Delta \bar{a}(Z_n)]^2} \quad (21)$$

при допущении, что погрешность определения площади водоема невелика.

Если суммарную и среднюю первичную продукцию находят для водоема, разграниченного на несколько обособленных участков, с помощью формул (6), (7) ошибки репрезентативности полученных величин $A(t)$ и $\bar{A}(t)$ определяют как при суммировании данных, уже имеющих некоторую погрешность:

$$\Delta A(t) = \sqrt{(\Delta A_1)^2 + (\Delta A_2)^2 + \dots + (\Delta A_n)^2}, \quad (22)$$

$$\Delta \bar{A}(t) = \frac{1}{S} \sqrt{(\Delta A_1)^2 + (\Delta A_2)^2 + \dots + (\Delta A_n)^2}. \quad (23)$$

Заметим, что при этом общая ошибка величины $\bar{A}(t)$, представляющей собой взвешенную среднюю арифметическую, зависит только от ошибок определения первичной продукции отдельных участков — $\Delta A_1, \Delta A_2, \dots, \Delta A_n$. Случайная ошибка, обусловленная различием самих величин A_1, A_2, A_n сводится к 0, поскольку $\bar{A}(t)$ находят для генеральной совокупности $A(t)$, в которой учтены все составляющие ее единицы.

Аналогично рассчитывают суммарную и среднюю величины первичной продукции и их погрешности для некоторого периода наблюдений. Следовательно, в отдельные моменты времени (t) имеются:

$$A(t_1); A(t_2) \dots A(t_n) \quad \text{и}$$

$$\Delta A(t_1); \Delta A(t_2) \dots \Delta A(t_n).$$

Искомую суммарную величину за период наблюдений находят по формуле (8), преобразуя которую, можно получить

$$\int_{t_1}^{t_n} A(t) dt = A = \frac{1}{2} [A(t_1)T_1 + A(t_2)(T_1 + T_3) + \dots + A(t_n)T_{n-1}]. \quad (24)$$

Тогда ошибка репрезентативности величины A равна

$$\Delta A = \frac{1}{2} \sqrt{[T_1 \Delta A(t_1)]^2 + (T_2 + T_3) \Delta A(t_2)^2 + \dots + [T_{n-1} \Delta A(t_n)]^2}. \quad (25)$$

Среднесуточная величина для этого периода определяется как

$$\bar{A} = \frac{1}{2(t_n - t_1)} [A(t_1)T_1 + A(t_2)(T_2 + T_3) + \dots + A(t_n)T_{n-1}]. \quad (26)$$

Ее погрешность равна

$$\Delta \bar{A} = \frac{1}{2(t_n - t_1)} \sqrt{[T_1 \Delta A(t_1)]^2 + [(T_2 + T_3) \Delta A(t_2)]^2 + \dots + [T_{n-1} \Delta A(t_n)]^2}. \quad (27)$$

С помощью таких же приемов могут быть вычислены ошибки репрезентативности величин первичной продукции, полученных другими методами, а также остальных показателей продуктивности фитопланктона и разнообразных характеристик водной среды.

Определение погрешностей увеличивает объем математической обработки результатов исследований, но она легко может быть реализована с помощью вычислительной техники. Необходимо оценивать погрешности результатов независимо от ожидаемой точности, поскольку на практике не всегда соблюдаются заданные ее интервалы. Вычисление погрешности получаемых данных позволяет дополнить их на разных этапах определения оценкой доверительного интервала — своего рода зоны неопределенности, необходимой для суждения о точности результатов исследования и путях ее повышения, о достоверности сделанных выводов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бульон В. В. Первичная продукция планктона // Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидробиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Фитопланктон и его продукция. Л., 1981.
2. Зайдель А. Н. Ошибка измерений физических величин. Л., 1974.
3. Пырина И. Л. Первичная продукция фитопланктона // Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. М., 1975.
4. Пырина И. Л. Определение подводной фотосинтетически активной радиации // Наст. сборник.
5. Пырина И. Л., Рутковская В. А. Зависимость интенсивности фотосинтеза волжского фитопланктона от проникающей в воду суммарной солнечной радиации // Биологические продукционные процессы в бассейне Волги. Л., 1976.
6. Пырина И. Л., Сметанин М. М. Об оценке средних для водоема значений количественных характеристик фитопланктона // Оценка погрешностей методов гидробиологических и ихтиологических исследований. Рыбинск, 1982.
7. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов: Лабораторное руководство. Л., 1974.
8. Терещенко В. Г., Сметанин М. М., Баканов А. И. Методы оценки погрешностей в экологических исследованиях // Оценка погрешностей методов гидробиологических и ихтиологических исследований. Рыбинск, 1982.
9. Vollenweider R. A., Talling J. F., Westlake D. F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook N 12. Oxford, 1974.

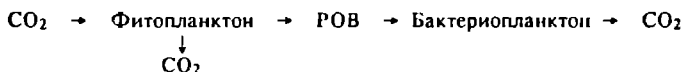
В. В. Бульон

Зоологический институт РАН

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ ФИТОПЛАНКТОНА И ЕЕ ПОТРЕБЛЕНИЕ ГЕТЕРОТРОФНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Обсуждается проблема выделения водорослями первичного органического вещества и его потребления бактериопланктоном. Оценено влияние этих процессов на результаты измерения фотосинтеза радиоуглеродным методом.

В связи с тем что стандартный радиоуглеродный метод определения скорости фотосинтеза планктона основан на измерении радиоактивности вещества в сестоне, растворенное органическое вещество (РОВ), выделяемое клетками водорослей, не учитывается. Возникает проблема оценки его доли в общем количестве первичного органического вещества и поиска методов, которые позволили бы учитывать как видимую скорость ассимиляции углерода, так и перераспределение ранних продуктов фотосинтеза внутри планктонного сообщества. Схематично это может быть представлено следующим образом:



Продукцию растворенного органического вещества или внеклеточную продукцию часто относят к прижизненным выделениям клеток водорослей, хотя не менее вероятной представляется гипотеза, предполагающая образование РОВ при их отмирании (лизисе, фотолизе, выедании и т. д.). Во многих случаях при средних и высоких величинах биомассы фитопланктона и первичной продукции, свойственных мезотрофным и эвтрофным водоемам, доля растворенных продуктов фотосинтеза оказывается незначительной. Высокие относительные величины внеклеточной продукции практически всегда регистрируются в олиготрофных водах.

Независимо от природы внеклеточной продукции остается актуальным вопрос о ее экологической роли. Путь исследования может быть намечен на основании приведенной выше схемы потока

углерода в сообществе автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов.

В литературе содержатся данные, позволяющие предполагать, что потребление РОВ гетеротрофными микроорганизмами тесно связано с его продуцированием, поэтому выделяемое фитопланктоном РОВ почти не аккумулируется в воде [3, 6, 8, 9]. Время оборота фитогенного РОВ составляет всего несколько часов, что подтверждается экспериментами с легко усвояемыми органическими субстратами, такими, как глюкоза, ацетат и аминокислоты [2, 5, 11].

Таким образом, при количественном исследовании внеклеточной продукции можно исходить из предпосылки, что выделяющееся из клеток фитопланктона РОВ тотчас ассимилируется бактериями. Следовательно, и при экспозиции проб озерной или морской воды с $^{14}\text{CO}_2$ по мере включения метки в органическое вещество фитопланктона и выхода из его клеток меченного РОВ последнее должно утилизироваться микрогетеротрофами. Методическая сторона проблемы заключается в том, как дифференцировать меченый фитопланктон и меченый бактериопланктон и сравнить их радиоактивности, чтобы оценить долю первичной продукции, трансформированную в бактериальную фракцию взвешенного органического вещества (ВОВ). Для этой цели можно рекомендовать метод ^{14}C в сочетании с дифференциальной, или ступенчатой, фильтрацией проб воды [1, 4, 7, 10].

В опытах, проводившихся на озерах Монголии летом 1979 г. и в юго-западной части Тихого океана (25—57° ю. ш. и 126—158° в. д.) в январе—феврале 1985 г., был применен вариант дифференциальной фильтрации (см. рисунок). Пробы воды после

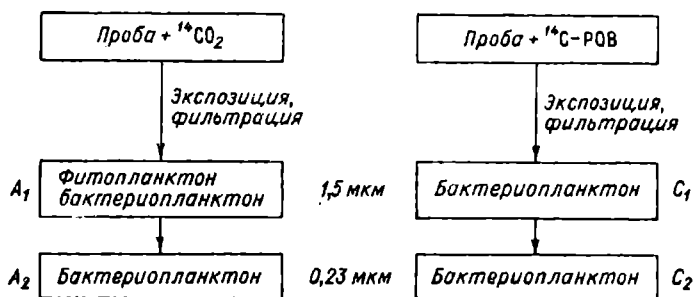


Схема дифференциальной фильтрации проб воды:

A_1 и A_2 — радиоактивность планктона на фильтрах с размером пор 1,5 и 0,23 мкм после экспозиции проб с $^{14}\text{CO}_2$; C_1 и C_2 — то же после экспозиции с меченым органическим субстратом.

экспозиции с $^{14}\text{CO}_2$ отфильтровывали сквозь мембранные фильтры с размером пор 1,5 мкм (озерная вода) или 0,85 мкм (морская вода). Радиоактивность планктона на этих фильтрах, а также эквивалентное ей количество ассимилированного углерода обозначали как A_1 . Затем фильтраты пропускали сквозь фильтры с размером пор 0,23 мкм. Радиоактивность планктона на фильтрах этого типа и эквивалентное ей количество ассимилированного углерода обозначали как A_2 . Предполагалось, что на первом этапе фильтрации мембранные фильтры задержат все клетки фитопланктона и часть бактериопланктона, на втором этапе фильтрации более плотные фильтры задержат остальную часть бактериопланктона. Чтобы учесть распределение гетеротрофных микроорганизмов на фильтрах разной плотности, по той же схеме проводили дифференциальную фильтрацию проб воды, предварительно проэкспонированных с тем или иным меченым органическим субстратом малой концентрации. В качестве субстратов использовали ацетат, глюкозу (в опытах с озерной водой) или гидролизат белка (в опытах с морской водой). Во всех опытах из данных по ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ вычитали данные темнового контроля, а из данных по ассимиляции меченых органических субстратов — величины адсорбции этих субстратов фильтрами. Если считать, что указанные органические субстраты ассимилируются только бактериями, то значения радиоактивности РОВ на фильтрах с размером пор 1,5 (или 0,85) и 0,23 мкм, которые обозначались как C_1 и C_2 , должны быть пропорциональны количеству бактерий на них.

Продукцию бактерий за счет меченого органического вещества, выделенного фитопланктоном, рассчитывали по уравнению

$$A_6 = A_2 (C_1/C_2) + A_2, \quad (1)$$

где A_6 — суммарная радиоактивность бактерий на фильтрах с размерами пор 1,5 (или 0,85) и 0,23 мкм, накопленная за счет меченых продуктов фотосинтеза; A_2 — радиоактивность бактерий, полученная от меченых продуктов фотосинтеза, на фильтрах с размером пор 0,23 мкм; C_1/C_2 — соотношение радиоактивностей бактерий после экспозиции с мечеными органическими субстратами на фильтрах с размерами пор 1,5 (или 0,85) и 0,23 мкм. Радиоактивность бактерий (A_6) или их продукция за счет фитогенного РОВ, отнесенная к общей радиоактивности микропланктона ($A_1 + A_2$), эквивалентной продукции фитопланктона, равна

$$\frac{A_6}{A_1 + A_2} = \frac{(A_2/A_1) (C_1/C_2) + 1}{1 + A_2/A_1} \quad (2)$$

Таким образом, для оценки доли первичной продукции планктона, ассимилированной бактериопланктоном, следует знать отношения A_2/A_1 и C_1/C_2 .

Результаты дифференциальной фильтрации проб озерной и морской воды после экспозиции с CO_2 и мечеными органическими субстратами показали, что в юго-западной части Тихого океана при экстремально низком фотосинтезе (1—4 мкг С/(л · сут)) отношения A_2/A_1 были в среднем в 3 раза выше, а C_1/C_2 почти во столько же раз ниже, чем в озерах, где скорость фотосинтеза достигла 85—300 мкг С/(л · сут):

Место наблюдений	Прозрачность по диску Секки, м	A_2/A_1	C_1/C_2
Озеро			
Хара-Нур	1,1	0,044	5,9
Ногон-Нур	1,0	0,035	7,4
Дургэн-Нур	6,0	0,038	2,3
Юго-Западная часть Тихого океана			
ст. 3042	22	0,196	1,01
ст. 3045	25	0,121	1,81
ст. 3049	25	0,146	0,89
ст. 3052	33	0,097	0,54
ст. 3055	20	0,123	0,76
ст. 3063	16	0,080	0,79

Отношения C_1/C_2 свидетельствуют о том, что большая часть микрогетеротрофов озерной воды (70—88 %) задерживалась на фильтрах с размером пор 1,5 мкм. Из морской воды, отличающейся высокой прозрачностью и, следовательно, малым содержанием взвешенных веществ, на фильтрах с размером пор 0,85 мкм задерживалась меньшая доля гетеротрофных микроорганизмов — 35—64 %. Очевидно, при мембранной фильтрации озерной воды, которая богаче взвесью, чем морская, фильтры с размером пор 0,85 мкм забиваются взвесью и становятся менее проницаемыми для бактерий, т. е. степень удержания ими бактериопланктона находится в прямой зависимости от концентраций взвеси в воде.

Подставив приведенные выше значения A_2/A_1 и соответствующие им отношения C_1/C_2 в уравнение (2), можно оценить долю первичной продукции планктона, утилизируемую бактериопланктоном. Для озерных и морских вод с резко различным уровнем трофии в бактериальную фракцию ВОВ включается от 12 до

33 %, в среднем 20 %, продукции фитопланктона (см. таблицу). Эти данные не противоречат результатам немногочисленных аналогичных или близких по теме работ [4, 7], согласно которым 20—30 % фиксированного при фотосинтезе $^{14}\text{CO}_2$ связывается затем с бактериальной фракцией BOB. Отношение $A_6 / (A_1 + A_2)$, по-видимому, слабо зависит от уровня первичной продукции.

Соотношение между величинами первичной продукции ($A_1 + A_2$) и продукции бактерий (A_6) за счет растворенных продуктов фотосинтеза (мкг С/(л · сут))

Место наблюдений	$A_1 + A_2$	A_6	$A_6 / (A_1 + A_2)$ %
Озеро			
Хара-Нур	115	30	26
Ногон-Нур	305	98	32
Дургэн-Нур	83	10	12
Тихий океан			
ст. 3042	2,50	0,82	33
ст. 3045	1,57	0,19	12
ст. 3049	1,02	0,24	24
ст. 3052	1,58	0,22	14
ст. 3055	2,29	0,44	19
ст. 3063	3,80	0,49	13

Часть ассимилированной бактериями первичной продукции подвергается минерализации до CO_2 , однако ее величина трудно поддается экспериментальному определению и обычно оценивается расчетным путем. Так, Ларсон и Хагстрем [7] для прибрежной зоны Северной Балтики определили, что при годовой первичной продукции 93 г С/м² бактериальная продукция составляет 29 г С/м² за счет органического вещества фитопланктона. Принимая эффективность роста бактерий равной 0,6, авторы [7] рассчитали, что 17 г С/м², или 15 % первичной продукции, минерализовалось до CO_2 бактериопланктоном. Следовательно, на эту величину должна быть увеличена первичная продукция, измеренная радиоуглеродным методом.

Расчетным путем можно проследить изменение потерь первичной продукции при дыхании бактериопланктона в зависимости от ее доли, утилизируемой микрогетеротрофами, и от эффективности их роста на фитогенном РОВ. Например, если отношение $A_6 / (A_1 + A_2)$ равно 20 %, то с уменьшением эффективности роста бактерий от 0,6 до 0,4 потери на минерализацию возрастают от 12 до 28 % общей первичной продукции. При отношении $A_6 / (A_1 + A_2)$, равном 30 %, потери первичной продукции на ды-

хание бактериопланктона при тех же коэффициентах эффективности роста составляют 17—38 %.

Таким образом, применение радиоуглеродного метода в сочетании с дифференциальной фильтрацией, позволяющей разделять автотрофные и гетеротрофные микроорганизмы, дает основание полагать, что около 20 % продуктов фотосинтеза непосредственным образом включается в бактериальную фракцию ВОВ. Приблизительно такая же доля первичной продукции подвергается, по-видимому, окислительной минерализации при дыхании бактериопланктона. Не исключено, что интенсивность потока углерода от фитогенного РОВ до CO_2 через бактериальное звено в большей мере, чем принято думать, влияет на степень отклонения показаний радиоуглеродного метода от валовой величины первичной продукции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бульон В. В. Всклочная продукция фитопланктона и методы ее определения // Гидробиол. журн. 1988. Т. 24, N 3.
2. Azam F., Holm-Hansen O. Use of tritiated substrates in the study of heterotrophy in seawater // Mar. Biol. 1973. Vol. 23, № 3.
3. Cole J. J., Likens G. E., Strayer D. L. Photosynthetically produced dissolved organic carbon: An important carbon source for planktonic bacteria // Limnol., Oceanogr. 1982. Vol. 27, N 6.
4. Derenbach J. B., Williams P. J. Autotrophic and bacterial production: fractionation of plankton populations by differential filtration of samples from the English Channel // Mar. Biol. 1974. Vol. 25, N 4.
5. Hobbie J. E., Grawford G. C. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters // Limnol., Oceanogr. 1969. Vol. 14, N 4.
6. Iturriaga R., Hoppe H. G. Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter // Mar. Biol. 1977. Vol. 40, N 2.
7. Larson U., Hagström A. Phytoplankton exudate release as an energy source for the growth of pelagic bacteria // Mar. Biol. 1979. Vol. 52, N 3.
8. Walte D. T., Duthie H. C. Heterotrophic utilization of phytoplankton metabolites by the microbiota of Sunfish Lake, Ontario // Verh. Int. Verein. Limnol. 1975. Bd 19, Pt. 1.
9. Weibe W. J., Smith D. F. Direct measurement dissolved organic carbon release by phytoplankton and incorporation by microheterotrophs // Mar. Biol. 1977. Vol. 42, N 3.
10. Wolter K. Bacterial incorporation of organic substances released by natural phytoplankton population // Mar. Ecol. Progr. Ser. 1982. Vol. 17, N 3.
11. Wright R. T., Hobbie J. R. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems // Ecology. 1966. Vol. 47, N 3.

В. И. Щербак

Институт гидробиологии АН Украины

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ АВТОРАДИОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Описывается процедура определения фотосинтетической активности отдельных клеток водорослей автораднографическим методом, его достоинства и недостатки. Дан обзор работ по оценке продуктивности разных таксономических групп и видов фитопланктона с помощью этого метода.

Одним из новых направлений исследования первичной продукции фитопланктона является оценка вклада в ее формирование различных таксономических групп и отдельных видов водорослей. Решение этих вопросов стало возможным благодаря применению метода автораднографии. Метод автораднографии в биологических исследованиях впервые был применен в России в 1904 г. при изучении локализации продуктов распада эманации радия в теле лягушки [6].

Автораднографию следует рассматривать как одну из модификаций скляночного метода, позволяющую определять скорость фотосинтеза отдельных видов водорослей. Специфика автораднографии заключается в определении радиоактивности водорослей с помощью фотоэмульсии, в которой остаются „следы” радиоактивных частиц. Образование „следов” вызвано тем, что в процессе приготовления фотоэмульсии на поверхности или внутри кристаллов галлоидного серебра происходит скопление изотопов этого элемента, ведущее к дефектам в структуре ионной решетки и появлению так называемых чувствительных центров, способных поглощать радиоактивные частицы и превращать ионы серебра в атомы. В результате создаются скрытые центры, которые благодаря восстановлению галлоидного серебра в процессе химического проявления приобретают видимое изображение. Важным фактором, определяющим пригодность фотоэмульсий для исследовательских целей, является однородность микрокристаллов серебра по чувствительности и размеру и их соотношение с желатиной.

В нашей стране наиболее доступны и часто используются в биологических исследованиях жидкие ядерные фотоэмульсии типа „М” (мелкозернистая), выпускаемые московским институтом ГосНИИхимпроект. Инструкции по подготовке фотоэмульсии для нанесения на препараты, процесс ее нанесения, экспозиция радиоавтографов, состав проявителя, методика проявления и необходимые правила, которые требуется соблюдать при этом, детально описаны в специальных работах [4, 11, 13, 21].

Применительно к фитопланктону методика авторадииографии заключается в определении радиоактивности клеток водорослей, которая пропорциональна количеству атомов поглощенного изотопа и рассчитывается по числу следов или треков радиоактивных частиц, оставленных в фотоэмульсии за время экспозиции.

Сравнение авторадииографии с другими методами определения продукции отдельных видов, в частности альгологическим [3], показывает целый ряд ее преимуществ. Во-первых, это возможность определить скорость фотосинтеза отдельных видов водорослей и их вклад в формирование первичной продукции альгоценоза в целом. Во-вторых, высокая чувствительность и разрешающая способность метода, позволяющая оценивать продукционные характеристики водорослей даже при их низкой физиологической активности. В-третьих, возможность использования в качестве метки, в зависимости от задач исследований, практически все изотопы химических элементов, включаемых водорослевыми клетками в свои метаболические процессы. Наконец, к достоинствам метода следует отнести и относительную его простоту, позволяющую проводить исследования в полевых условиях непосредственно на водоеме.

Недостатки авторадииографического метода условно можно разделить на две группы. Первые определяются тем, что авторадииография, являясь одной из модификаций скляночного метода, включает все его слабые стороны [7]. Вторые связаны со спецификой использования жидкой фотоэмульсии для учета радиоактивности водорослей. Как известно, в фотоэмульсии создается фон из восстановленных зерен серебра без действия на них радиоактивного излучения, используемого в качестве „метки” изотопа. Это может происходить под влиянием космического излучения, при произвольном „старении” фотоэмульсии от длительного хранения, механическом давлении, использовании недостаточно чистой химической посуды, воздействии различных химических веществ. Для предотвращения этих артефактов необходимо строгое соблюдение требований, предъявляемых к работе с фотоэмульсией [3, 4, 10, 11, 13, 21]. Поскольку фитопланктон представляет собой смесь различных по величине и форме клеток и ценобиев, находящихся в разном геометрическом соотношении с фотоэмульсией, толщина ее слоя, покрывающего водоросли и определяющего количество подверженных действию ионизации

зерен серебра, может быть различной. Этот недостаток можно устранить покрытием автордиоавтографа слоем желатины перед нанесением фотоэмульсии [3]. Возможна субъективная ошибка при подсчете зерен восстановленного серебра над водорослевыми клетками, который производится визуально под световым микроскопом, так как глаз исследователя не всегда точно запоминает" расположение всех зерен. Для упрощения процедуры подсчета рекомендуют различные приспособления, но при этом возникают осложнения, связанные со спецификой их использования [4].

В практике работ с использованием автордиографии в зависимости от задач и технического обеспечения применяются различные методические подходы [3, 9, 14—16, 18, 20]. Однако при всей специфичности в каждом из них можно выделить общие этапы процедуры проведения исследований.

1. Определяют видовой состав и численность фитопланктона в выделении доминирующих видов, пользуясь общепринятыми альгологическими методами.

2. Измеряют суммарную первичную продукцию сообщества водорослей радиоуглеродной модификацией скляночного метода.

3. Концентрируют взвесь радиоактивного фитопланктона (необходимо не менее 200—300 мкг) и наносят ее на предметные стекла в виде альгологического препарата.

4. Препараты с радиоактивными водорослями покрывают жидкой фотоэмульсией и полученные радиоавтографы экспонируют в темноте в течение нескольких суток (время экспозиции зависит от чувствительности применяемой фотоэмульсии и радиоактивности водорослей, обусловленной их фотосинтетической активностью).

5. На проявленных радиоавтографах подсчитывают количество восстановленных зерен серебра вокруг клеток водорослей (для получения достоверных результатов необходимо учесть по 20—40 клеток видов, слагающих основную часть исследуемого сообщества).

6. Относительную продукцию (R_i) каждого вида вычисляют по формуле $R_i = (\bar{a}_i N_i) / \bar{a}$, где \bar{a}_i — среднее количество восстановленных зерен серебра на клетку, N_i — количество клеток данного вида в единице объема. Абсолютную скорость продукции (A_i) вида рассчитывают по формуле $A_i = A R_i$, где A — суммарная скорость продукции фитопланктонного сообщества [3, 19, 23].

Первые публикации с детальным описанием специфики автордиографии и рекомендацией по ее применению в экологии водорослей появились в конце 60-х — начале 70-х гг. [10, 12, 17, 19, 22, 23], у нас в стране — в 1973 г. [2]. С тех пор выполнено достаточно много работ, позволивших подойти к оценке относи-

тельного значения отдельных водорослей в суммарной продукции фитопланктона [1, 3, 5, 8, 14, 15].

И все же следует признать, что автораддиография еще не нашла широкого применения в гидробиологии, несмотря на возможность получения высокоинформативных данных, так необходимых при изучении функционирования первичного звена водных экосистем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко Н. А., Шишкин Б. А. О первых результатах определения продукции водорослей методом радиоавтографии // Круговорот вещества и энергии в водоемах: Тез. докл. У Всес. лимнол. совещ. Лиственичное на Байкале, 2—4 сент. 1981 г. Иркутск, 1981. Вып. 1.
2. Гутельмахер Б. Л. Радиоавтографический метод определения относительного значения отдельных видов водорослей в первичной продукции планктона // Гидробиол. журн. 1973. Т. 9, № 1.
3. Гутельмахер Б. Л. Метаболизм планктона как единого целого. Л., 1986.
4. Епифанова О. И., Терских В. В., Захаров А. Ф. Радиоавтография. М., 1977.
5. Кузьменко Л. В., Сергеева Л. М. Первичная продукция тропических районов Индийского океана // Экология моря. 1981. № 5.
6. Лондон Е. С. О физиологическом значении эманиции радия // Русский врач. 1904. № 3.
7. Федоров В. Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. М., 1979.
8. Щербак В. И. Продукция фитопланктона и его трофическая роль в экосистеме Киевского водохранилища: Автореф. дис....канд. биол. наук. Киев, 1987.
9. Щербак В. И. Метод автораддиографии в гидробиологических исследованиях // Вопросы гидробиологии водоемов Украины. Киев, 1988.
10. Banerjee S. N., Horaley R. J. Radioautographic studies in synchronized cultures of *Oedogonium cardiacum* // Amer. J. Bot. 1968. Vol. 55, N 4.
11. Boyd G. A. (Бойд Д.) Автораддиография в биологии и медицине. М.; Л., 1957.
12. Brock M. L., Brock T. D. The apical of microautoradiographic techniques to ecological studies // Mitt. Internat. Verein. Limnol. 1968. N 15.
13. Budd G. G. Autoradiography for biologist. L., 1972.
14. Desortova B. Productivity of individual algae species in natural phytoplankton assemblage determined by means of autoradiography // Arch. Hydrobiol. 1976. Bd 49, H. 4.
15. Davenport J. B., Maquire B. Quantitive grain density autoradiography and the intraspecific distribution of primary productivity in phytoplankton // Limnol., Oceanogr., 1984. Vol. 29, N 2.
16. Faust M. A., Correl D. L. Autoradiographic study to detect metabolically active phytoplankton and bacteria in the Rhode River estuary // Mar. Biol. 1977. Vol. 41, N 4.
17. Fuhs G. W., Canelli E. S. Phosphorus-33 autoradiography used to measure phosphate uptake by individual algae // Limnol., Oceanogr. 1970. Vol. 15, N 4.
18. Knoechel R., Kalff J. The advantages and disadvantages of grain density track autoradiography // Limnol., Oceanogr. 1979. Vol. 24, N 6.
19. Maquire B., Neill W. Species and individual productivity in phytoplankton communities // Ecology. 1971. Vol. 52, N 5.

20. Paerl H. W., Stull E. A. In defense of grain density autoradiography // *Limnol., Oceanogr.* 1979. Vol. 24, N 6.
21. Rogers A. W. (Роджерс Э.) Авторадиография. М., 1972.
22. Stull E. A., Amezcaga E. L., Goldman C. R. The contribution of individual species of algae to primary productivity of Castle Lake, California // *Verh. Int. Ver. Limnol.* 1971. Vol. 18, N 3.
23. Watt W. D. Measuring the primary production rates of individual phytoplankton species in natural mixed population // *Deep—Sea Res.* 1971. Vol. 18, N 3.

В. А. Елизарова

Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАНОПЫТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ФИТОПЛАНКТЕРОВ
АЛЬГОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Описывается методика определения интенсивности роста естественных популяций планктонных водорослей и расчет продукции их биомассы за время вегетации. Приведены данные для фитопланктона Рыбинского водохранилища.

Исследования структуры сообществ, круговорота органического вещества, пищевых объектов фитофагов, математическое моделирование водных экосистем и прогнозирование качества воды требуют знания продукции биомассы отдельных видов водорослей, входящих в состав фитопланктона. Непосредственно она определяется только альгологическим методом — по скорости роста вида или по приросту клеток.

Популяционную скорость роста устанавливают экспериментально в условиях, близких к естественным. Максимальное приближение достигается в опытах *in situ* с фитопланктонным сообществом, изолированным в контролируемом объеме воды, обмениваемом с окружающей средой. Используют прозрачные сосуды объемом 0,1—3 л: стеклянные и плексигласовые трубки, затянутые планктонным газом или мелкопористыми (диаметр около 1 мкм) мембранными фильтрами, диализные мешки, садки, камеры [2, 7—14].

Непременное условие таких экспериментов, особенно при исследовании диатомовых, — сохранение взвешенного состояния фитопланктона. этого можно достичь экспонированием опытного материала при повышенном волнении воды. Уже через двое суток экспозиции в таких условиях у *Diatoma elongatum*, например, вместо одиночных клеток, типичных для лабораторной культуры, появляются зигзагообразные колонии, характерные для парящей природной формы. С другой стороны, сильное гидродинамическое

воздействие губит заключенные в сосуды цианобактерии (синезеленые водоросли), такие, как *Aphanizomenon flos-aquae* и виды из рода *Anabaena*. Их лучше изучать в штילевой обстановке, тем более что плавучесть им обеспечивают газовые вакуоли.

Крупный зоопланктон удаляют из опытной воды, как правило, фильтрованием через планктонный газ № 36—39. Правда, в результате этой процедуры часть водорослей изымается. Существенно (до 65 %) снижается биомасса цианобактерий, хотя при сильном цветении ими такое снижение представляется полезным для эксперимента. Биомасса диатомовых водорослей уменьшается незначительно, в пределах 10 %.

Опытные сосуды на некоторое время подвешивают на глубине, где световые условия близки к оптимальным для фотосинтеза. Большинство фитопланктов активнее растет в первые сутки, но некоторые, например *Aphanizomenon flos-aquae*, — на вторые [3]. Увеличение времени экспозиции до 2—3 сут желательно поздней осенью при температуре воды 2—7 °С, когда рост измеряется десятками и сотыми долями удвоений клеток в сутки.

Следует очень осторожно распространять на природные популяции ростовые характеристики культур водорослей, даже полученные в условиях *in situ*. По данным специального исследования в таких экспериментах культуры хлорококковых адаптированные к вегетации на воде из Рыбинского водохранилища, росли весной и летом быстрее, а осенью медленнее естественных популяций [5].

Популяционная скорость роста выражается количеством удвоений клеток в сутки и вычисляется по формуле

$$\frac{1}{\ln 2} \frac{\ln N_k - \ln N_0}{t},$$

где N_0 и N_k — численность клеток соответственно до и после экспозиции, t — время экспозиции, сут.

По скорости роста и численности вида в водоеме рассчитывают суточную продукцию клеток и биомассы. Если прослежена сезонная динамика скорости роста и численности, то определяют продукцию клеток за время вегетации фитопланктона, суммируя величины за отдельные периоды, например, недели. Последние, в свою очередь, находят по среднесуточным (среднеарифметическим) из значений в начале и конце недели, принимая, что численность и темп роста в течение недели остаются

постоянными. Для иллюстрации можно привести пример расчета продукции клеток *Microcystis aeruginosa*:

Период	Численность, млн. кл/л	Скорость роста, удв. кл/сут	Продукция, млн. кл/л	
			за сутки	за период
29 VI—6 VII	—		0	0
6—13 VII	0,03	4,1	82	658
13—20 VII	3,7	3,5	20	158
20—27 VII	0,2	3,7	25	200
27 VII—3 VIII	1,8	3,7	12	92
3—10 VIII	7,0	2,0	30	239
10—17 VIII	6,8	2,4	22	175
17—24 VIII	15,2	2,4	37	294
24—31 VIII	13,5	2,0	68	548
31—VIII—9 IX	15,9	1,3	20	159
6 VII—9 IX				2523

Ниже приведены также общие результаты определения продукции клеток и биомассы основных представителей планктонной альгофлоры Рыбинского водохранилища за период вегетации, полученные на основании еженедельных односуточных опытов (табл. 1). Опыты ставили в вегетационные сезоны 1979 г. (изучали диатомеи), 1981 г. (цианобактерии) и 1983 г. (зеленые).

Среди цианобактерий повышенной продукцией клеток за сутки и за время вегетации выделялся возбудитель цветения воды *Microcystis aeruginosa*, а продукцией сырой биомассы (с учетом среднего объема клетки) — *Anabaena spiroides*. Самую высокую суточную продукцию клеток из всех исследованных диатомовых имел мелкоклеточный *Stephanodiscus minutulus*. Благодаря этому продукция его клеток за время вегетации, которое ограничено всего одним месяцем, приближалась к таковой видов, вегетирующих на протяжении всего вегетационного сезона. Наивысшая продукция биомассы за сутки и за время вегетации была присуща самому крупноклеточному и длительно вегетирующему организму — *Stephanodiscus hantzschii*. В обеих группах водорослей амплитуда колебаний суточной продукции биомассы одинаковая — от 0,1 до 1,2—1,3 г/м³, однако диатомеям свойственны значения до 0,6 г/м³, а более мелким цианобактериям — выше 0,7. Благодаря высокой суточной продукции за сравнительно небольшой срок цианобактериальные виды образуют 50—90 г/м³ сырой биомассы, как и большинство диатомей, вегетирующих продолжительнее.

Зеленые хлорококковые водоросли из-за малочисленности трудно поддаются точному учету. Однако для двух из них,

Таблица 1

Производство клеток и биомассы исследованных водорослей Рыбинского водохранилища

Вид	Объем клетки, мкл ³	Период вегетации	Продукция			
			млн. кл./л		за сутки	г/м ³
			за сутки	за время вегетации		
Цианобактерии						
<i>Microcystis aeruginosa</i>	33,51	6 VI—9 IX	31,5	2523	1,0	84,5
<i>M. pulverea</i>	14,14	29 VI—26 VIII	17,5	1262	0,2	17,8
<i>Arhanizomonon flos-aquae</i>	75,36	29 VI—26 VIII	9,4	680,4	0,7	51,3
<i>Anabaena spiroides</i>	113,10	29 VI—26 VIII	11,3	811,6	1,3	91,8
<i>A. schetemetievae</i>	576,00	29 VI—13 VIII	1,6	89,2	0,9	51,4
<i>A. lemmermannii</i>	65,45	29 VI—29 VII	1,1	45,0	0,1	3,0
Диатомеи						
<i>Stephanodiscus minutulus</i>	199	V	4,3	105,4	0,9	21,0
<i>S. incognitus</i>	340	VI—X	1,2	215	0,4	73,0
<i>S. hantzschii</i>	1327	V, VII—X	0,9	145	1,2	193,0
<i>S. binderanus</i>	1020	V—VI, VIII—X	0,6	86,0	0,6	87,7
<i>Skeletonema subsalsum</i>	196	V, VII—X	1,5	288,1	0,3	56,5
<i>Diatoma elongatum</i>	802	V—VI, IX—X	0,9	112,4	0,7	90,1
<i>Aulacoseira italica</i> subsp. <i>subarctica</i>	392,5	V—IX	0,6	107,8	0,2	42,3
<i>A. italica</i>	730	IX—X	0,3	29,5	0,3	21,5
<i>A. granulata</i>	917	VIII—X	0,2	32,8	0,2	30,3
<i>Asterionella formosa</i>	576	V—VI, IX—X	0,2	25,7	0,1	14,8

Scenedesmus quadricauda и *S. acuminatus*, удалось получить достоверные сведения по продукции биомассы (г/м^3):

Вид	Объем клетки, м	Период вегетации	Суточная продук- ция	Продукция за время вегетации
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	73	28 IV—4 XI	0,02	2,8
<i>S. acuminatus</i>	73	28 IV—2 IX	0,002	0,3

Низкую плотность популяций этих мелких водорослей в водоеме можно было бы связать с выседанием зоопланктоном. Но оказывается, они медленно растут. В результате этого, а также небольших размеров клеток, продукция их биомассы за сутки и время вегетации на один-два порядка ниже, чем у самых малопродуктивных диатомей и цианобактерий, хотя оба сценедесмуса вегетируют с ранней весны до поздней осени [4].

Литературные данные по прямому определению продукции видов планктонных водорослей, сопоставимые с нашими, немногочисленны. Так, в Иркутском водохранилище продукция клеток *Asterionella formosa* за время вегетации в 2,5 раза ниже [6], чем в Рыбинском. Эта разница заметно сглаживается при оценке продукции биомассы — около 15 и 11 г/м^3 , соответственно в Рыбинском и Иркутском водохранилищах вследствие вдвое большего среднего объема клетки *Asterionella formosa* в последнем. В Рыбинском водохранилище продукция биомассы основных видов рода *Aulacosira* за время их вегетации составляет 22—42 г/м^3 (см. табл. 1), в Иркутском водохранилище у *A. baicalensis* она не превышает 5—6 г/м^3 .

Таблица 2

Средние за время вегетации суточные P/B -коэффициенты
исследованных водорослей в Рыбинском водохранилище

Вид	P/B -коэффициент	Вид	P/B -коэффициент
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	0,5	<i>Microcystis aeruginosa</i>	4,0
<i>S. binderanus</i>	1,0	<i>M. pulvereae</i>	3,1
<i>Diatoma elongatum</i>	1,0	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	2,3
<i>Asterionella formosa</i>	1,2	<i>Anabaena spiroides</i>	3,1
<i>Skeletonema subsalsum</i>	1,8	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,0
		<i>S. acuminatus</i>	1,6

Интересно сопоставить суточные P/B -коэффициенты, основанные на наших прямых измерениях прироста биомассы (табл. 2), и полученные для водорослей Ладожского озера радиоавтографическим методом, позволяющим оценивать этот показа-

тель косвенно, по фотосинтетической активности отдельных клеток [1]. Диапазон колебаний этого показателя оказался одинаковым у диатомей обоих водоемов: 0,5—1,8 из Рыбинского водохранилища и, как правило, 0,4—2,1 из Ладоги; P/B -коэффициенты цианобактерий из водохранилища равны 2,3—4,0, что на порядок ниже, чем у двух представителей группы в озере — 43,3 и 55,0. Для зеленых Ладоги приведены величины единичных наблюдений, равные соответственно 5,7 и 10,6 сут⁻¹. В водохранилище близкая величина P/B -коэффициента (6 сут⁻¹) отмечена у *Scenedesmus acuminatus* лишь в разгар лета:

Дата.....	28 IV	5 V	12 V	19 V	26 V	2 VI	16 VI	30 VI
P/B	0,3	0,2	1,9	0,1	0,8	1,6	6,1	4,7
Дата.....	7 VII	14 VII	21 VII	28 VII	4 VIII	11 VIII	18 VIII	25 VIII
P/B	3,9	1,2	0,6	0,4	1,7	0,2	0,4	0,9

Заметим, что P/B -коэффициенты, превышающие 2 сут⁻¹, обусловлены существенным приростом среднего объема клетки, что хорошо видно на примере данных для *Scenedesmus quadricauda*:

Дата.....	12 V	19 V	26 V	2 VI	9 VI	4 VIII	11 VIII	18 VIII
P/B	1,2	2,2	0,9	2,8	0,3	1,5	1,5	1,2
Прирост объема, мкм.....	Отриц.	33	Отриц.	53	Отриц.	0,4	0,4	Отриц.

Это означает, что высокие P/B -коэффициенты могут не соответствовать столь же большому числу удвоений клеток, в результате чего в отдельных случаях возможны их величины порядка нескольких единиц.

Таким образом, альгологический метод позволяет получить ценную информацию для понимания закономерностей формирования биомассы планктонных водорослей из образованного при фотосинтезе органического вещества. Поэтому при изучении первичной продукции фитопланктона желательно обращаться к этому методу, несмотря на его большую трудоемкость.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гутельмахер Б. Л., Петрова Н. А. (Gutelmacher B. L., Petrova N. A.) Production of individual species of algae and its role in the productivity of phytoplankton in Ladoga Lake // Int. Rev. gesamt. Hydrobiol. 1982. Vol. 67, N 5.
2. Елизарова В. А. Некоторые данные о скорости размножения планктонных водорослей в прибрежье Рыбинского водохранилища // Гидробиологические характеристики водохранилищ волжского бассейна. Л., 1982.
3. Елизарова В. А. Интенсивность роста и продукция массовых планктонных синезеленых водорослей в Рыбинском водохранилище // Биология и экология водных организмов. Л., 1986.
4. Елизарова В. А. Интенсивность роста *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. и *S. acuminatus* (Lagerh.) Chod. в планктоне Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1989. № 84.
5. Елизарова В. А. Об использовании культур при изучении скорости роста водорослей в планктоне // Биология внутренних вод: Информ. бюл. Л., 1989. N 81.
6. Кожова О. М. Продукция фитопланктона Иркутского водохранилища // Биология Иркутского водохранилища. М., 1964.
7. Кондратьева Т. М. Определение суточной продукции фитопланктона в Севастопольской бухте // Первичная продукция морей и внутренних вод. Минск, 1961.
8. Кондратьева Т. М. Роль отдельных видов и размерных групп планктонных водорослей в первичной продукции тропической зоны Атлантического океана // Биология моря. Киев, 1977. № 42.
9. Furnas M. J. An evaluation of two diffusion culture techniques for estimating phytoplankton growth rates in situ // Mar. Biol. 1982. Vol. 70, N 1.
10. Heath L. R. Some preliminary results from a new method for studying phytoplankton physiology in the field // Mar. Biol. Lett. 1982. Vol. 3.
11. Owens O. V. H., Dresler P., Grawford C. C., Tyler M. A., Seliger H. H. Phytoplankton cages for the measurement in situ of the growth rates of mixed natural populations // Chesapeake Sci. 1977. Vol. 18, N 4.
12. Pierr J. F. Etude expérimentale du comportement in situ d'une population diatomique maintenue en enceinte dialysante // Hydrobiologia. 1969. Vol. 33, N 3—4.
13. Toth L. G. The use of dialyzing sacks in estimation of production of bacterioplankton and phytoplankton // Arch. Hydrobiol. 1980. Vol. 89, N 4.
14. Vihnálek V. Growth rates of phytoplankton populations in Rimov reservoir (Czechoslovakia) estimated by the in situ technique of dialysis chambers // International conference on reservoir limnology and water quality. Abstracts. 1987.

Ю. М. Лебедев

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН***БАЛАНСОВЫЙ МЕТОД И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ
ПРОДУКЦИИ В ВОДОТОКАХ**

Рассмотрены условия применимости, достоинства и недостатки метода определения первичной продукции в водотоках по динамике растворенных газов в воде.

Хотя скляночный метод достаточно широко применяется при измерениях первичной продукции и дыхания в речных экосистемах [3, 5, 8, 28], в характерных для рек условиях высокой турбулентности он дает заниженные результаты [13, 14]. Поэтому для водотоков предпочтительно применение так называемого балансового метода. Наиболее полное описание этого способа измерения первичной продукции дано в сводке Холла и Молла [13].

Метод баланса основан на учете временного хода содержания в воде какого-либо химического ингредиента, связанного с процессами метаболизма в водной экосистеме. Измеряемые компоненты — преимущественно газы, в первую очередь кислород. Метод был разработан С. В. Бруевичем на морских водоемах (цит. по [2]), а в 1956 г. модифицирован Одумом для рек [25]. В английской литературе основоположником метода считается Одум.

При использовании балансового метода первичная продукция рассчитывается по уравнению

$$\frac{dC}{dt} = P - R + k_2(C_t - C_s) + A, \quad (1)$$

где C — концентрация газа, t — время, P — валовый фотосинтез, R — дыхание в экосистеме, k_2 — коэффициент атмосферной реаэрации, C_t — концентрация газа в период наблюдения, C_s — насыщающая концентрация газа, A — изменение содержания газа за счет приточности. В отличие от других, этим

методом определяется первичная продукция и деструкция не в отдельном звене (планктон, бентос), а в экосистеме в целом.

В „классическом” варианте предложено несколько раз в сутки измерять изменение концентрации газа, например кислорода, при пробегании воды между двумя створами. Необходимое расстояние между створами можно определить из отношений [6]:

$$L = \frac{Q \Delta C}{W(fM - R)} \quad (2)$$

где L — расстояние между створами; M , Q — расходы воды, ($\text{м}^3/\text{ч}$); ΔC — изменение концентрации кислорода между станциями ($\text{г}/\text{м}^3$) (выбирается в зависимости от возможной точности измерения); W — средняя ширина водотока (м); f — коэффициент абсорбции кислорода в столбе воды ($\text{м}/\text{ч}$); M — средний дефицит насыщения воды кислородом между створами ($\text{г}/\text{м}^3$); R — ночное дыхание в экосистеме ($\text{г O}_2/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$). Измерение расходов и времени пробегания воды между створами представляет самостоятельную задачу, часто трудно решаемую (см., например, [16]).

Из уравнения (1) следует, что река в этом случае рассматривается как одномерная структура. Такой подход оправдан не всегда. Однако уже двумерное описание массопереноса требует значительного усложнения уравнения (1) и увеличения объема информации, необходимой для его решения, т. е. возрастания количества отбираемых проб.

Одум [25] высказал предположение, что для гомогенных водотоков возможно проведение измерений на одном створе. Впервые такой метод был применен на небольшом пруду Уэлчем [34], который полагал, что метод O_2 -баланса наиболее приемлем для спокойных вод. Однако это заключение ошибочно, поскольку в таких водоемах составляющие трехмерной диффузии имеют в большинстве случаев примерно один порядок. При попытке применить метод одноточечного измерения баланса в оз. Мичиган были получены результаты, трудно поддающиеся интерпретации [21]. То же отмечено в обзорной работе [13]. Позднее была продемонстрирована возможность применения метода одного створа для рек [4, 9, 30].

Основное возражение, выдвигаемое против балансового метода измерения первичной продукции, — трудность правильного определения величины атмосферной реаэрации. Одум применял разные методы. Один из них основан на определении гидродинами-

¹ В оригинале уравнение приведено с ошибкой.

ческих характеристик путем введения раствора флуоресцина в поверхностный слой воды и дальнейшего учета времени выравнивания его концентрации по глубине с вычислением коэффициента атмосферной реэрации (k_2) по Фелпсу [26]. Другой метод состоял в учете дыхания под колпаками, установленными на дно в ночные часы. Разность между изменением концентрации кислорода в открытой воде и под колпаком давала величину атмосферной реэрации. Параллельно измеренные обоими методами величины различались примерно в 3 раза. В расчетах Одума применялась средняя величина. Еще один метод, предложенный им [25], состоит в расчете коэффициента k_2 по изменению содержания кислорода в воде в ночные часы (модификация уравнения (1)):

$$k_2 = \frac{z(q_m - q_0)}{S_m - S_0}, \quad (3)$$

где z — глубина водотока, q_m — скорость изменения концентрации O_2 в предутренние часы, q_0 — то же в послезакатные часы, S_m — предрассветный дефицит насыщения воды O_2 , S_0 — то же для вечера.

К прямым методам относится определение коэффициента k_2 по изменению содержания кислорода в воздухе под пластиковым куполом, устанавливаемом на поверхности воды [7]. Однако в связи с тем что купола дают парниковый эффект, их можно использовать только ночью. Существует метод, основанный на введении в водоток сульфита натрия (Na_2SO_3) или, что лучше, газообразного азота [13] с целью деоксигенации воды и дальнейшем прямом определении скорости поступления кислорода из атмосферы. Этот метод может быть использован только на небольших водотоках.

Наиболее широко распространены расчетные методы, базирующиеся на эмпирических уравнениях, связывающих коэффициенты реэрации с гидравлическими характеристиками водотоков [1]. Из последующих публикаций заслуживают внимания исследования Живоглоу и Уэллейса, проведенные с помощью мечен O_2 (по [24]), в результате которых получено простое уравнение:

$$k_2 = C \frac{\Delta h}{T}, \quad (4)$$

где h — перепад уровней воды на исследуемом участке (м); T — время добегания (ч); C — константа, равная 0,177 для O_2 и 0,154 для CO_2 .

Разнообразие методов определения коэффициентов атмосферной реэрации связано с тем, что ни один из них не обладает универсальностью. Так, использование уравнения (3) иногда приводит к получению нереальных результатов [10], но в ряде случаев оно вполне приемлемо [9, 23, 29]. Возникающие при применении уравнения (3) ошибки обусловлены изменением интенсивности дыхания в течение суток, которое обычно выше в вечерние часы, чем в утренние, особенно в очень продуктивных водотоках.

И только в реках средней и низкой продуктивности дыхание в течение ночи меняется мало [15]. Во избежание ошибок при определении коэффициента реэрации предложено сравнивать режим кислорода на двух сходных участках реки, один из которых закрыт пластиковой пленкой [11]. Однако этот метод неприменим на крупных реках, а также при пересыщении воды газами.

В ряде мелководных рек с быстрым течением суточные колебания кислорода отсутствуют, поскольку они маскируются высокой атмосферной аэрацией, но если имеется хорошо выраженная амплитуда рН, можно применить CO_2 -технику. Например, такой способ применяли Райт и Миллс [35] в исследованиях на Медисон—Ривер (Йелоустонский национальный парк) — небольшом водотоке с глубиной 0,36—1,09 м, скоростью течения 0,36—0,68 м/с, получающем питание из термальных источников. Этот метод также рекомендуется в обзоре Холла и Молла [13].

Из приведенного выше уравнения (4) следует, что отношение констант для O_2 и CO_2 равно 1,15, т. е. использование CO_2 -техники измерения баланса, казалось бы, позволяет проводить наблюдения при несколько более высоких значениях k_2 и соответственно больших скоростях течения. Но это кажущееся преимущество исчезает, если принять, что дыхательный коэффициент меньше 1. Кроме того, как показал Таллинг [32], точность определения CO_2 в природных водах не может быть лучше чем ± 1 мкмоль/л (0,044 мг/л), а кислорода — $\pm 0,3$ мкмоль/л (0,01 мг/л). Следовательно, даже если принять дыхательный коэффициент равным 1, точность балансового метода, основанного на учете баланса кислорода, оказывается по крайней мере втрое выше, чем при определении углекислоты.

Практические рекомендации в работах с использованием баланса CO_2 сводятся к предложению определять изменения его содержания по величине рН. Для установления связи CO_2 —рН в природных водах Холл и Молл [13] рекомендуют определять изменения рН при добавлении к речной воде дистиллированной с известным содержанием CO_2 . Однако такая добавка изменяет

ионную силу раствора и в итоге приводит к расхождению реальных и эмпирических характеристик искомой зависимости. Причем для олиготрофных слабо забуференных вод, где связь CO_2 —pH выражена наиболее четко, прибавление дистиллированной воды сильнее меняет ионную силу раствора и расхождение между эмпирической и реальной кривыми возрастает. В жестких водах, на которые добавка дистиллированной воды сказывается слабее, изменение концентрации CO_2 вызывает меньший сдвиг pH. К этому следует добавить, что из-за наличия в природных водах ряда веществ, загрязняющих электроды, точность определения pH в лабораторных условиях не может быть выше 0,05, а в полевых — 0,1 единицы [18]. Это нашло отражение практически во всех руководствах по гидрохимическому анализу природных вод, хотя иногда чувствительность прибора смешивается с точностью его измерений [35].

Таким образом, CO_2 -техника измерения баланса не дает преимуществ перед кислородной, отличаясь меньшей чувствительностью. Справедливо отметить, что многое сказанное здесь относительно измерения первичной продукции по балансу CO_2 близко к соображениям, ранее сформулированным Г. Г. Винбергом [2].

Расхождения между результатами определения фотосинтеза и дыхания балансовым методом с параллельным использованием O_2 - и CO_2 -техники варьируют весьма существенно. Так, в р. Гриде (Нидерланды) валовая первичная продукция, измеренная по динамике того и другого ингредиента, составила соответственно 247 и 283 моль $\text{O}_2 / (\text{м}^2 \cdot \text{сут})$ [17]. Однако в Уайт-Клей-Крик (Пенсильвания, США), где пересыщение воды углекислотой достигало 340—800 % и требовалась значительная поправка на атмосферную реаэрацию, а отклонение содержания кислорода от равновесной не превышало 10 %, синхронные измерения по O_2 - и CO_2 -балансу дали соответственно 0,39 и 2,81 г C/($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$) для чистой продукции и 3,11 и 6,77 г C/($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$) — для дыхания [6]. Обратная картина наблюдалась на р. Хавельзе (Дания), где отношение валовой первичной продукции, измеренной по изменениям концентрации CO_2 , к рассчитанной по балансу кислорода, составило в среднем 0,59 г C/($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$), дыхания — 0,58 г C/($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$) [31]. Практически полное совпадение данных получено лишь для хорошо контролируемых условий искусственного водотока [19]: 820 параллельных измерений с использованием O_2 -техники дали величину чистой продукции 0,836 г о.в./($\text{м}^2 \cdot \text{сут}$) с использованием CO_2 — 0,832 (пересчет наш).

В условиях водотоков балансовый метод дает более высокие величины первичной продукции, чем метод склянок, в которых фотосинтез может быть ограничен отсутствием турбулентного перемешивания. Этот факт принимается во внимание в ряде работ [13, 20], и полученные методом склянок данные рассматриваются как ориентировочные [22]. В некоторых случаях пытаются имитировать условия турбулентности свободным подвешиванием склянок так, чтобы их покачивало [8, 22], или инкубированием проб в пластиковых мешках, влекомых течением [13]. Однако возникающая при этом турбулентность гораздо ниже, чем в открытой воде. Очевидно поэтому при наблюдениях на р. Эльбе отношение валового фотосинтеза, измеренного в склянках, к оцененному методом O_2 -баланса находилось в пределах 0,05—0,46 и в среднем было равно 0,30 [27], в трех реках Огайо (США) фотосинтез и дыхание, рассчитанные по балансу CO_2 , были в 2—3 раза больше, чем измеренные в склянках [33].

Таким образом, балансовый метод следует считать единственным приемлемым и методологически наиболее обоснованным для определения первичной продукции в текучих водах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзатуллин Т. А., Лебедев Ю. М. Моделирование трансформации органических загрязнений в экосистемах и самоочищение водотоков и водоемов // Общая экология. Биоценология. Гидробиология. Итоги науки и техники. М., 1977. Т. 4.
2. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
3. Ермолаев В. И. Продуктивность фитопланктона р. Пясины у пос. Тарей (Западный Таймыр) // Гидробиол. журн. 1972. Т. 8, № 6.
4. Лебедев Ю. М., Зубец В. Н., Сабусова Г. А., Сморов М. А. Зимний кислородный режим Нижнего Амура // Биологические компоненты ландшафта восточной зоны БАМа. Хабаровск, 1979.
5. Соловых Г. Н. Биопродукционные процессы в р. Урал // Гидробиол. журн. 1974. Т. 10, N 1.
6. Bott T. L., Brock J. T., Cushing C. E. et al. A comparison of methods for measuring primary production and community respiration in streams // Hydrobiologia. 1978. Vol. 60, N 1.
7. Copeland B. J., Duffer W. R. Use of clear plastic dome to measure gaseous diffusion rates in natural waters // Limnol., Oceanogr. 1964. Vol. 9, N 4.
8. Ertl M. Primarna produkcia planktonu zo stredného toku Dunaja a jej vzťah k teplotě a množstvu chlorofylu // Biol. prace. 1976. T. 22, N 4.
9. Fischer S. G., Carpenter S. R. Ecosystem and macrophyte primary production in the Fort River ecosystems, Massachusetts // Hydrobiologia. 1976. Vol. 49, N 2.
10. Flemer D. A. Primary productivity of the north branch of the Raritan River, New Jersey // Hydrobiologia. 1979. Vol. 35, N 2.
11. Grím N. B., Fischer S. G. Exchange between interstitial and surface water implications for stream metabolism and nutrient cycling // Hydrobiologia. 1984. Vol. 111, N 3.
12. Hall C. A. S. Migration and metabolism in a temperate stream ecosystem // Ecology. 1972. Vol. 53, N 4.

13. Hall C. A. S., Moll R. Methods of assessing aquatic primary productivity // *Ecol. stud.* 1974. Vol. 14.
14. Heuer J. H. An evaluation of the Thames River Watershed, Connecticut, using estimates of community metabolism // *Storrs. Agr. Exp. Stoct. Univ. Conn. Bull.* 1975. N 435.
15. Hornberger G. M., Kelly M. G., Eller R. M. The relationship between light and photosynthetic rate in river community and implications for water quality modelling // *Water. Resource Res.* 1976. Vol. 12, N 4.
16. John P. H. Discharge measurement in lower order streams // *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 1978. Vol. 63, N 6.
17. Kelly M. G., Thyssen N., Moeslund B. Light and the annual variation of oxygen and carbon-based measurements of productivity in a macrophyte-dominated river // *Limnol., Oceanogr.* 1983. Vol. 28, N 3.
18. Kemp P. H. Chemistry of natural waters. 3. Carbonic acid // *Water Res.* 1971. Vol. 5, N 8.
19. Kevern N. R., Ball R. C. Primary productivity and energy relationships in artificial streams // *Limnol., Oceanogr.* 1965. Vol. 10, N 1.
20. McConell W. J., Sigler W. F. Chlorophyll and productivity in a mountain river // *Limnol., Oceanogr.* 1959. Vol. 4, N 3.
21. Manny B. A., Hall C. A. S. Diurnal changes in stratification and dissolved oxygen in the surface waters of Lake Michigan // *Proc. 12 th Conf. Gr. Lakes Res.* Ann Arbor., 1969.
22. Marxen J. Untersuchungen zur Ökologie der Bakterien in der fließenden Welle von Bächen. I. Chemismus, Primärproduktion, CO₂-Dunkelfixierung und Eintrag von partikulärem organischen Material // *Arch. Hydrobiol.* 1980. Suppl. 57, N 4.
23. Minshall G. W. Autotrophy in stream ecosystem // *Bioscience.* 1978. Vol. 28, N 2.
24. Neal L. A. Oxygen sag and stream purifications // *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 1974. Vol. 46, N 6.
25. Odum H. T. Primary production of flowing waters // *Limnol., Oceanogr.* 1956. Vol. 1, N 2.
26. Odum H. T. Trophic structure and productivity of Silver Springs, Florida // *Ecol. Monogr.* 1957. Vol. 27, N 1.
27. Peukert V. Die Primärproduktion der Elbe in Abhängigkeit von Globabstrahlung, Lichtklima und Temperatur // *Limnologica.* 1976. Vol. 10, N 3.
28. Rosemarin A. S. Comparison of primary productivity (¹⁴C) per unit biomass between phytoplankton and periphyton in the Ottawa River near Ottawa, Canada // *Verh. Int. Ver. Limnol.* 1975. Bd 19, Pt. 2.
29. Servais F., Debecker E., Billen A. Annual cycle of gross primary production and respiration in the Viron River (Belgium) // *Hydrobiologia.* 1984. Vol. 111, N 1.
30. Shnurr J. M., Ruchti J. Dynamics of O₂ und CO₂ exchange, photosynthesis and respiration in rivers from time-delayed correlation with ideal sunlight // *Limnol. Oceanogr.* 1977. Vol. 22, N 2.
31. Simonsen W. T., Harremoes P. Oxygen and pH fluctuations in rivers // *Water Res.* 1978. Vol. 12, N 7.
32. Talling J. F. The application of some electrochemical methods to the measurement of photosynthesis and respiration in fresh waters // *Freshwater Biol.* 1973. Vol. 3, N 4.
33. Verduin J. Photosynthesis by aquatic communities in northwestern Ohio // *Ecology.* 1959. Vol. 40, N 3.
34. Welch H. C. Use of modified diurnal curves for the measurement of metabolism in standing water // *Limnol., Oceanogr.* 1968. Vol. 13, N 4.
35. Wright J. C., Mills I. K. Productivity studies on the Madison River, Yellowstone National Park // *Limnol., Oceanogr.* 1967. Vol. 12, N 4.

В. М. Гольд, Н. М. Минеева,
З. Г. Гольд, И. М. Попельницкая

*Красноярский университет, Институт биологии
внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН*

ДЫХАНИЕ ФИТОПЛАНКТОНА. ПРОБЛЕМЫ И МЕТОДЫ

Обсуждается роль дыхания в продукционном процессе. Рассмотрены методические подходы к оценке дыхания фитопланктона.

При изучении продуктивности фитопланктона и планктонного сообщества в целом дыхание относят к чисто энтропийному процессу, характеризующему физиологические потери. Данное положение фиксируется в общем балансовом уравнении, согласно которому продукция (P) соответствует разности интенсивности фотосинтеза (A) и дыхания (R):

$$P = A - R. \quad (1)$$

Это уравнение широко используется при интерпретации данных по первичной продукции и деструкции органического вещества и их соотношению величине $A:R$.

Однако с биоэнергетических позиций абсолютизация такого подхода представляется не совсем корректной. Для гетеротрофного звена планктонного сообщества (бактерио- и зоопланктона) очевидно, что продуктивность рассчитывается как производная интенсивности дыхания [1]. Частично это может относиться и к фотоавтотрофному звену (фитопланктону), для которого показана возможность гетеротрофного типа питания, например, для синезеленых водорослей в афотической зоне. На свету тоже трудно представить продукционный процесс без включения биохимических и биоэнергетических реакций дыхания при синтезе структурных элементов клетки и ее деления.

По современным представлениям физиологии растений, в суммарных показателях дыхания выделяются две энергетические составляющие: дыхание на рост или накопление (R_g) и дыхание на поддержание (R_m) [2]. Для их разделения предложена формула

$$R = R_g + R_m = KA + \frac{BC}{\bar{\epsilon}}, \quad (2)$$

где A — валовый фотосинтез, K — коэффициент пропорциональности (для высших растений он принимается равным 0,25), B — сухая биомасса, C — постоянный коэффициент, с размерностью „время — 1“, $\bar{\epsilon}$ — переходный коэффициент от параметров биомассы к газообмену.

Подразумевается, что при дыхании на накопление происходит связывание части энергии во вновь образующихся в процессе роста структурных элементах. Эта энергия остается в системе. Следовательно, с позиции биоэнергетики применительно к фитопланктону основную часть общего балансового уравнения продукционного процесса правильнее записывать следующим образом:

$$P = A + R_g - R_m. \quad (3)$$

Уравнение (3) не исчерпывает всех потенциальных возможностей участия дыхания в продукционном процессе фитопланктона, так как описывает дыхание на накопление исключительно за счет первичных продуктов фотосинтеза. При этом не учитывается возможность гетеротрофного и миксотрофного питания с потреблением внеклеточных органических соединений, также связанного с функционированием дыхательных систем.

Механизм энергетического обеспечения потребления экзогенных веществ при гетеротрофном типе питания достаточно хорошо изучен. Это активное поглощение — симпорт за счет энергии АТФ дыхания, индуцирующей разность электрохимического потенциала ионов водорода на внешней мембране. Менее изучен механизм миксотрофного типа питания. Фотостимулирующее действие на поглощение экзогенных соединений может происходить по крайней мере за счет двух процессов. Первый связан с дополнительным образованием при фотосинтезе субстрата для систем дыхания с последующим включением обычных каналов энергообеспечения активного транспорта. Второй поддерживается функционированием в плазмалемме аутооксидабельной укороченной редокс-цепи, аналогичной электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) дыхания, с участием фотовосстановителя, образующегося в хлоропластах в результате фотосинтеза [8, 10]. Энергетические преимущества такого типа утилизации световой энергии в случае индукции поглощения экзогенных органических веществ очевидны [6].

У сине-зеленых водорослей взаимоотношения фотосинтеза с дыханием еще более усложнены. Для них показано [39], что на уровне полипептидного комплекса b_6/f существует точка пересечения ЭТЦ фотосинтеза и дыхания. Это снижает по сравнению

с зелеными водорослями как фотосинтез, так и уровень миксотрофного питания, что подтверждено экспериментально [7]. Отток продуцированного при фотосинтезе электрона на O_2 в ущерб фиксации CO_2 у сине-зеленых, вероятно, способствует сохранению ЭТЦ фотосинтеза и „выживанию“ клеток в поверхностном слое воды, где они вынуждены функционировать при высоком уровне энергетической освещенности.

Таким образом, анализ проблем дыхания фитопланктона подчеркивает огромную роль этого процесса в обеспечении функциональной активности водорослей. Данное положение относится не только к водорослям, но и к другим составляющим планктонного сообщества, для которого, как правило, определяется суммарное дыхание. Учитывая таксономическую специфичность параметров связи дыхания с особенностями функционирования фито-, бактерио- и зоопланктона, следует стремиться к дифференцированной оценке интенсивности этого процесса в сообществе планктонных организмов. Без решения этой задачи трудно реализовать энергетический подход к комплексному изучению водных экосистем на строго количественной основе.

При определении дыхания фитопланктона наиболее предпочтительны экспериментальные методы. Однако их использование связано с трудностями дифференцирования вклада водорослей в общую скорость этого процесса, обусловленную всеми компонентами сообщества, особенно в природных водах.

Методической основой экспериментального определения дыхания служат методы газового анализа, применяемого в физиологии растений [5]: респирометрия [11, 23, 34, 38], полярография [3, 48], масс-спектрометрия [27, 49, 55], радиоуглеродный метод [17, 44, 51]. В настоящее время получает распространение электрохимическое определение растворенного кислорода с использованием различных модификаций оксиметров.

При работе с культурами или монодоминантным сообществом водорослей, характерным для цветения водоема, дыхание фитопланктона может быть оценено прямыми измерениями с допущением, что доля дыхания бактерий и зоопланктона незначительна. Однако по отношению к полидоминантному планктонному сообществу такой подход некорректен. В этом случае используются разнообразные варианты разделения организмов планктона [9, 12, 15, 18, 20, 21, 24, 31]. Например, проводят дробную фильтрацию исходной пробы через мельничный газ с диаметром пор 70—120 мкм для отделения крупного зоопланктона, затем через мембранные фильтры (размер пор 3—6 мкм) для отделения фитопланктона. В фильтрованных пробах оценивается интенсивность газообмена. Дыхание фитопланктона может быть рассчитано как разность скорости потребления кислорода в исходной пробе и

пробе после обеих фильтраций или по разности этой скорости после первой и второй фильтраций.

Результаты апробации метода весьма противоречивы. В некоторых опытах деструкция органических соединений в фильтрах снижалась по сравнению с исходной пробой: в Пролетарском и Веселовском водохранилищах в августе 1981 г. на 34 и 63 % [9], в оз. Сиверском в июле 1983 г. на 70 %, а в оз. Плещеево в августе и сентябре того же года на 25 и 60 % [12]; для Рыбинского водохранилища в среднем за сезон снижение составляло 20 % [19]. Известны и противоположные результаты. Так, на Красноярском водохранилище дыхание бактериопланктона после второй фильтрации оказалось значительно выше, чем в исходных пробах: 45 % в 1983 г. и 33 % в 1984 г. Очевидно, разделение планктонного сообщества фильтрацией не дает одинакового эффекта в разных условиях. Возможно также, что сама процедура фильтрации и разделения сказывается на таком чувствительном к внешним факторам процессе, как дыхание.

Более корректным представляется использование радиоуглеродного метода [18, 40, 51, 53]. При этом определяется количество $^{14}\text{CO}_2$, выделенного в темноте фитопланктоном, который предварительно экспонировался на свету в присутствии меченого бикарбоната, с введением поправки на гетеротрофную ассимиляцию углекислоты. На основании полученных данных с помощью системы уравнений можно рассчитать парциальное дыхание фито-, зоо- и бактериопланктона [9, 21]. Результаты подобных экспериментов показывают, что доля свежесинтезированных органических соединений, затраченных на дыхание водорослей, в среднем составляет от 4—8 % [53] до 10—15 % [51] от максимального фотосинтеза. Однако такой подход предполагает, что при дыхании фитопланктона используются только первичные продукты фотосинтеза и не учитывается возможность вовлечения органических соединений внешней среды — экзометаболитов и аллохтонных органических веществ.

В последнее время получает распространение оценка интенсивности дыхания фитопланктона по активности электрон-транспортной цепи (ЭТЦ). При этом для выделения растительной компоненты из суммарного дыхания сообщества используется соотношение между активностью ЭТЦ и скоростью выделения кислорода [35, 36]. Первые такие исследования были выполнены на пробах морского планктона [42, 43]. В дальнейшем метод был применен при изучении дыхания планктона пресных вод [28], а также водорослей, разделенных дробной фильтрацией на размерные фракции [45, 46, 52]. Однако на пути внедрения этого метода в практику гидробиологических исследований могут быть серьезные затруднения, связанные со спецификой организации ЭТЦ дыхания и фотосинтеза у различных групп водорослей. Кроме

того, возможно включение ЭТЦ дыхания в восстановление нитратов и сульфатов — альтернативные потоки с участием терминальных нитрат- и сульфатредуктаз.

В силу неопределенности экспериментальных данных при определении дыхания фитопланктона широкое распространение получили также расчетные методы. Дыхание при этом принимается равным определенной доле (обычно 10 %) от максимального фотосинтеза [12, 14—16, 41]. Из результатов такой оценки для водоемов разного типа следует, что в среднем доля дыхания фитопланктона (R_{ϕ}) от общей деструкции органического вещества (R_0) колеблется в пределах 8—19 %. При этом на примере Рыбинского водохранилища было показано, что около 20 % величин R_{ϕ} превышали суммарную деструкцию органического вещества, которая в этом случае, за редким исключением, была ниже 0,1 мг O_2 / (л · сут), а 20 % величин R_{ϕ} составляли более половины R_0 [12].

Полученные результаты вполне укладываются в пределы разброса, отмечаемого при оценке доли дыхания фитопланктона с использованием методов дробной фильтрации. Тем не менее данный подход также встречает ряд возражений. Во-первых, здесь опять предполагается, что субстратом дыхания служат исключительно первичные продукты фотосинтеза. Во-вторых, не учитывается возможное различие интенсивности поглощения кислорода на свету и в темноте [25, 55], в том числе за счет фотодыхания, которое существует у водорослей [26, 30, 32, 33, 37, 47].

Отмеченными недостатками страдают и другие расчетные способы, в которых дыхание в той или иной степени привязано к интенсивности фотосинтеза. Например:

$$R_{\phi} = 2 A_6 - A_{24} \quad [29], \quad (4)$$

$$R_{\phi} = \frac{I_{24}}{I_6} (A_6 - A_{24}) \quad [50], \quad (5)$$

где R_{ϕ} — дыхание фитопланктона, A_6 , A_{24} — интенсивность фотосинтеза по радиоуглероду при 6-часовой и суточной экспозиции, I_6 и I_{24} — энергия солнечной радиации за 6 ч и сутки.

Дыхание фитопланктона может быть вычислено также на основании прямого определения биомассы и фотосинтеза [54]:

$$R_{\phi} = B_c - B_{\tau}, \quad B_{\tau} = B_c \frac{A_c + \tau}{A_c}, \quad (6)$$

где $R_{\text{ф}}$ — дыхание фитопланктона, $B_{\text{с}}$ и $B_{\text{т}}$ — биомасса водорослей в пересчете на углерод после световой и темновой экспозиции, $A_{\text{с}}$, $A_{\text{с+т}}$ — количество ассимилированного меченого углерода после экспозиции на свету (с) и с последующим периодом темноты (с + т).

В связи с тем что ни один из рассмотренных экспериментальных и расчетных методов не даст удовлетворительной картины при оценке дыхания фитопланктона, делаются попытки использовать для решения этой проблемы балансовый подход. В таком случае

$$R_{\text{ф}} = R_0 - R_6 - R_3, \quad (7)$$

где R_0 — интенсивность дыхания планктонного сообщества, оцениваемая экспериментально; R_6 , R_3 — дыхание бактерио- и зоопланктона, рассчитанное на основании экспериментально измеренных физиологических характеристик и численности или биомассы отдельных таксономических групп организмов [1]. При введении соответствующих параметров формула (7) приобретает вид

$$R_{\text{ф}} = R_0 K_c - \frac{(N_t - N_0) Q K_c 24}{t \cdot 2,303 \lg N_t / N_0} - \sum_{i=1}^n \frac{a_i w_i^b N_i K_c 24}{t q}, \quad (8)$$

где R_0 — общая интенсивность дыхания организмов в пробе за 24 ч, K_c — оксикалорийный коэффициент, N_t , N_0 — конечная и начальная численности бактерий за время экспозиции, Q — потребление кислорода одной бактериальной клеткой, a_i , w_i^b — скорость потребления кислорода i -го вида зоопланктона с индивидуальной массой w , N_i — количество особей, $q = 2,25^{0,1/20-T}$ — температурная поправка.

Такой подход, использованный при изучении активности планктона эвфотной зоны Красноярского водохранилища, показал, что в общей интенсивности дыхания сообщества значительную долю (около половины) составляет фитопланктон [15].

Высокий процент дыхания водорослей в общем потреблении кислорода планктонным сообществом может вызвать возражения, если придерживаться концепции экологического метаболизма [22], согласно которой основная роль фитопланктона сводится к накоплению в экосистеме продуктов фотосинтеза. Однако следует иметь в виду, что в эволюции биологических систем срабатывает принцип целесообразности и водорослям необходимо активно по-

треблять кислород и на свету, и в темноте, чтобы обеспечить собственную жизнедеятельность. Поэтому вполне логично представить, что доля дыхания для фитопланктона, в частности при цветении воды, не должна быть ниже, чем для бактериопланктона, значительно уступающего водорослям по биомассе. В этой связи может быть объяснено физиологическое значение „внеклеточной“ продукции фитопланктона [4]. Водоросли не обладают органами для запасаания значительного количества синтезированных веществ, вследствие чего подвергаются эффекту фотоингибирования, который возможен при отсутствии оттока ассимилятов (эффект сенсорной регуляции) [13]. Вероятно, поэтому они секретируют часть продуктов фотосинтеза в окружающую среду, которая в данном случае выполняет функцию „запасающей ткани“, обеспечивая тем самым высокий уровень фотосинтеза в течение светлого времени суток и возможность функционирования в темноте. При истощении внутренних резервов клетки могут востребовать собственные запасы, заключенные во внеклеточной продукции.

Таким образом, анализ существующих подходов к дифференциальной оценке дыхания фитопланктона показывает, что надежных и объективных методов практически нет. Необходимы дальнейшие поиски в этом направлении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимов А. Ф. Введение в продукционную гидробиологию. Л., 1989.
2. Бихеле З. Н., Молдау Х. А., Росс Ю. К. Математическое моделирование транспирации и фотосинтеза растений при недостатке почвенной влаги. Л., 1980.
3. Брандт А. Б., Киселева М. И. Изменение фотосинтетической активности клеток синхронной культуры хлореллы в разных областях спектра // Биол. науки. 1978. 19 с. Деп. в ВИНТИ. 17.08.1978, № 2965—78 Деп.
4. Бульон В. В. Внеклеточная продукция фитопланктона и методы ее определения // Гидробиол. журн. 1988. Т. 24, № 3.
5. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М., 1975.
6. Гольд З. Г., Гаевский Н. А., Попельницкий В. А. Влияние антропогенных загрязнений на перестройку пресноводных альгоценозов // Экологическая химия водной среды: Матер. I Всес. школы. Кишинев, 24—26 октября 1985. М., 1988.
7. Гольд В. М., Гольд З. Г. Существуют ли новые подходы к оценке продуктивности фитопланктона // Красноярский университет. 1989. 27 с. Деп. в ВИНТИ. 06. 02. 1989, № 1048—Б 89.
8. Иванкина Н. Г. Светиндуцированные электрические потенциалы фотосинтезирующих растений: Автореф. дис....канд. биол. наук. Красноярск, 1984.
9. Кравцова Г. В., Вольвич Л. В., Катрецкий Ю. А. О роли компонентов планктона в разрушении органического вещества // Гидробиол. журн. 1987. Т. 23, № 4.
10. Миклашевич А. И. Редокс реакции плазмалеммы фотосинтезирующих растительных клеток и их связь с электрическим метаболизмом и транспортом веществ: Автореф. дис....канд. биол. наук. Красноярск, 1989.

11. Микрякова Т. Ф. Действие и последствие температуры на скорость дыхания *Chlorella pyrenoidosa* // Физиология водных организмов и их роль в круговороте органического вещества. Л., 1969.
12. Минеева Н. М. Закономерности формирования первичной продукции фитопланктона водоемов разного типа: Дис....канд. биол. наук. Борок, 1986.
13. Мокроносов А. Т. Онтогенетический аспект фотосинтеза. М., 1981.
14. Обозначения, единицы измерения и эквиваленты, встречаемые при изучении продуктивности пресных вод. Л., 1972.
15. Попельницкая И. М., Гольц В. М., Гольд З. Г., Мучкина Е. Я. Сравнительная оценка двух способов расчета дыхания фитопланктона Красноярского водохранилища // Комплексные исследования экосистемы бассейна реки Енисей. Красноярск, 1985.
16. Приймаченко А. Д. Фитопланктон и первичная продукция Днепра и Днепровских водохранилищ. Киев, 1981.
17. Романенко В. И. Скорость потери органического вещества клетками планктонных аодорослей // Биология внутренних вод; Информ. бюл. Л., 1971. № 9.
18. Романенко В. И. Интенсивность дыхания и фотосинтеза микрофлоры в фильтрованных и нефильтрованных пробах воды в Волге // Биология внутренних вод; Информ. бюл. Л., 1973. № 18.
19. Романенко В. И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л., 1985.
20. Романенко В. И., Добрынин Э. Г. Потребление кислорода, темновая ассимиляция CO_2 и интенсивность фотосинтеза в натуральных и профильтрованных пробах воды // Микробиология. 1973. Т. 47, вып. 4.
21. Федоров В. Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. М., 1979.
22. Хайлов К. М. Экологический метаболизм в море. Киев, 1971.
23. Эйнон Л. О., Колесников П. А. Об обмене гликолевой и глиоксальной кислот у хлореллы // ДАН УССР. 1963. № 10.
24. Bell R. T., Kuparinen J. Assessing phytoplankton and bacterioplankton production during early spring in Lake Erken, Sweden // Appl. and Environ. Microbiol. 1984. Vol. 48, N 6.
25. Bender M., Grande K., Johnson K. e. a. A comparison of four methods for determining planktonic community production // Limnol., Oceanogr. 1987. Vol. 32, N 5.
26. Bindloss M. E. Primary productivity of phytoplankton in Loch Leven, Kinross // Proceeding of the Royal Society of Edinburg. 1974. Vol. 74.
27. Bunt J. S. Measurement of photosynthesis and respiration in marine diatom with the mass spectrometer and with carbon-14 // Nature. 1965. Vol. 207, N 5004.
28. Devol A. H., Packard T. T. Seasonal changes in respirator enzyme activity and productivity in Lake Washington microplankton // Limnol., Oceanogr. 1978. Vol. 23, N 1.
29. Eppley R. W., Sharp J. H. Photosynthetic measurements in the central North Pacific: the dark loss of carbon in 24-hour incubation // Limnol., Oceanogr. 1975. Vol. 20, N 6.
30. Findenegg G. R., Fischer K. Apparent photorespiration of *Scenedesmus obliquus*: decreases during adaptation to low CO_2 level / Z. Pflanzenphysiol. 1978. Bd 89, II 4.
31. Gibson C. E. A field and laboratory study of oxygen uptake by planktonic blue-green algae // J. Ecol. 1975. Vol. 63, N 3.
32. Harris G. P. Photosynthesis, productivity and growth: The physiological ecology of phytoplankton // Arch. Hydrobiol., Ergebn. Limnol. 1978. H. 10.
33. Jewson D. II. The interaction of components controlling net phytoplankton photosynthesis in a well-mixed lake (Lough Neagh, Northern Ireland) // Freshwater Biol. 1976. Vol. 6, N 6.
34. Karydis M. Short-term effects of hydrocarbons on the photosynthesis and respiration of some phytoplankton species // Bot. Mar. 1979. Vol. 22, N 5.

35. Kenner R. S., Ahmed S. J. Correlation between oxygen utilization and electron transport activity in marine phytoplankton // Mar. Biol. 1975. N 33.
36. Kenner R. A., Ahmed S. J. Measurement of electron transport activity in marine phytoplankton // Mar. Biol. 1975. N 33.
37. Lex M., Silvester W. B., Stewart W. D. P. Photorespiration and nitrogenase activity in blue-green algae *Anabaena cylindrica* // Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. 1972. Vol. 180, N 1058.
38. Mantal K. E., Haase C. Some factors affecting photosynthesis and respiration in *Cladophora glomerata* // J. Great Lakes. Res. 1977. Vol. 3, N 3—4.
39. Mullineaux C. W., Allen I. F. The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool // Febs. Lett. 1986. Vol. 205, N 1.
40. Nixdorf B. A method for estimation of phytoplankton dark losses by application of C-14 technique // Int. Conf. on Reservoir Limnol. and Water Quality: Abstracts. Ceske Budejovice, 1987.
41. Odum E. (Одум Е.) Экология. М., 1968.
42. Packard T. T. Respiration and respiratory electron transport activity in plankton from Northwestern African upwelling area // J. Mar. Res. 1979. Vol. 37, N 4.
43. Packard T. T., Healy M. L., Richards F. A. Vertical distribution of the activity of the respiratory electron transport system in marine plankton // Limnol., Oceanogr. 1971. Vol. 16, N 1.
44. Peterson B. J. Radiocarbon uptake: its relation to the net particulate production // Limnol., Oceanogr. 1978. Vol. 23, N 1.
45. Rai H. Size-dependent respiratory-enzyme activity and primary production of microplankton in Schöhsee (a North German Baltic lake) // Arch. Hydrobiol. 1984. Bd 102, H 2.
46. Rai H. Activity of the respiratory electron transport system (ETS) in different size particles as a measure of carbon losses from primary production // Int. Rev. ges. Hydrobiol. 1988. Vol. 73, N 6.
47. Reynolds C. S. The ecology of freshwater Phytoplankton. Cambridge, 1984.
48. Sheridan R. P. Toxicity of bisulfite to photosynthesis and respiration // J. Phycol. 1978. Vol. 14, N 3.
49. Shiraiva Y., Bader K. P., Schmid G. H. Mass-spectrometric analysis of oxygen gas exchange in high- and low-CO₂ cells of *Chlorella vulgaris* // Z. Naturforsch. 1988. Vol. 43, N 9—10.
50. Smith W. O. The respiration of photosynthetic carbon in eutrophic areas of the ocean // J. Mar. Res. 1977. Vol. 35, N 3.
51. Smith W. O., Barber R. T. A carbon budget for the autotrophic ciliate *Mesodinium rubrum* // J. Phycol. 1979. Vol. 15, N 1.
52. Span A. S. W. Optimisation of the electron transport system (ETS) method for natural phytoplankton assemblages tested with some species of freshwater phytoplankton // Water Res. 1986. Vol. 20, N 12.
53. Steemann-Nielsen E., Hansen V. K. Measurement with carbon-14 technique of the respiration rates in natural population of phytoplankton // Deep-Sea Res. 1959. N 5.
54. Tilzer M. M., Dubinsky Z. Effect of temperature and day length on the mass-balance of Antarctic phytoplankton // Polar. Biol. 1987. N 7.
55. Weger H. G., Birch D. G., Elrif I. R., Turpin D. H. Ammonium assimilation requires mitochondrial respiration in the light. A study with the green alga *Selenastrum* // Plant Physiol. 1988. Vol. 86 N 3.

Л. Е. Сигарева

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН*

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИГМЕНТОВ ФИТОПЛАНКТОНА В СМЕШАННОМ ЭКСТРАКТЕ

Рассматриваются теоретические основы и процедура спектрофотометрического определения хлорофиллов „а“, „b“, „с“, феопигментов и каротиноидов в общем экстракте из сестона, обсуждаются причины искажения результатов.

Спектрофотометрический анализ пигментов в общем экстракте благодаря простоте и доступности широко используется для изучения продуктивности фитопланктона разнотипных водосмов. На его основе калибруются не прямые методы определения хлорофилла, включая дистанционные. К настоящему времени опубликовано много рекомендаций, помогающих грамотно осуществить этот метод [5, 9, 17, 31, 33, 47]. В нашей стране разработан государственный стандарт, регламентирующий определение хлорофилла в природных водах [5]. Однако теоретические основы метода освещены в гидробиологической литературе недостаточно ясно, что затрудняет понимание полученных результатов и снижает качество работ по пигментам фитопланктона.

Спектрофотометрический метод основан на измерении количества света, поглощаемого раствором пигментов при заданных длинах волн [6]. Концентрация пигментов рассчитывается в соответствии с законами Бугера—Ламберта—Бера, характеризующими связь между концентрацией вещества и интенсивностью поглощенного им монохроматического света [6, 20]. Для определения содержания исследуемых веществ выбирается область спектрального максимума. Величину поглощения выражают обычно в единицах оптической плотности (E), которая представляет собой логарифм отношения интенсивности луча света, входящего в раствор, к интенсивности выходящего. Другим показателем поглощенного излучения является пропускание (T), которое характеризуется процентным отношением интенсивности света, выходящего из раствора, к поступившему. Взаимосвязь между пропу-

сканием (T) и оптической плотностью (E) описывается уравнением

$$E = \lg \frac{1}{T} = -\lg T.$$

Формулы для расчета концентраций пигментов в смешанном экстракте составляются с учетом двух основных условий.

1. Концентрация вещества (C) прямо пропорциональна оптической плотности раствора (E) и обратно пропорциональна удельному коэффициенту поглощения света веществом (α) и толщине спектрофотометрируемого слоя (l):

$$C = \frac{E}{\alpha l}.$$

2. Общее поглощение света смесью нескольких веществ на какой-нибудь длине волны равно сумме оптических плотностей отдельных компонентов:

$$E_{\text{общ}} = E_1 + E_2 + E_3 + \dots E_n.$$

Основной показатель, необходимый для расчета концентраций, — удельный коэффициент экстинкции, который характеризует количество света, поглощаемое 1-сантиметровым слоем раствора 1 г пигмента в 1 л (или 100 мл).

В экстракте из сестона находятся пигменты, имеющие перекрывающиеся спектры поглощения света, поэтому оценка их концентраций усложняется. Для расчета содержания хлорофиллов „а“, „b“ и „с“ решается система трех уравнений с тремя неизвестными. При этом учитывается поглощение света каждым пигментом на длинах волн (664, 647, 630 нм), соответствующих их спектральным максимумам. Известно несколько вариантов таких уравнений [40, 42, 47], отличающихся использованием различных удельных коэффициентов экстинкции. В последнее время используются уравнения Джеффри и Жамфри [26], основанные на уточненных применительно к хлорофиллам водорослей значениях этих коэффициентов. Результаты, полученные с помощью трехволновых уравнений, близки к истинным только при соблюдении ряда условий [41, 44], основное из которых — отсутствие в экстракте других пигментов и веществ непигментной природы, поглощающих свет на измеряемых длинах волн. Однако это условие практически невыполнимо, поскольку экстракт из сестона всегда содержит вещества с неизвестными оптическими свойствами. По этой причине расхождение результатов спектрофотометрического и хроматографического методов может быть весьма существенным [10, 23, 25, 32, 44].

Основные этапы спектрофотометрического определения пигментов следующие: концентрирование планктона в отобранных пробах воды, извлечение пигментов, измерение оптической плотности (или пропускания) экстракта, расчет концентраций.

Планктон концентрируют на мембранные фильтры с диаметром пор от 0,6 до 1—3 мкм: „мытищинские“ № 4—6, „Владипор“, ядерные, чешские марки „Synpor“ № 1—4. Отечественные фильтры могут иметь поры нестандартного размера, быстро забивавшиеся взвесью, что затрудняет фильтрацию. Лучшими считаются нерастворимые в ацетоне ядерные [9] и стекловолоконистые фильтры [27, 28]. При выборе фильтров нужной марки следует знать возможные потери во время фильтрации.

Объем профильтрованной воды варьирует от нескольких миллилитров до десятков литров в зависимости от численности клеток водорослей. Особенно трудно сконцентрировать необходимое количество планктона при исследовании водосема с высоким содержанием детрита и минеральных взвесей в сочетании с низкой численностью водорослей. В таких случаях следует увеличить площадь фильтрующей поверхности.

Перед фильтрацией на фильтрах образуют подложку из толченого стекла для облегчения последующего разрушения клеток [2], а также вещества (CaCO_3 , MgCO_3 , BaCO_3), предотвращающие феофитинизацию хлорофилла [47]. Однако эти вещества адсорбируют пигменты. Наиболее сильным адсорбентом является CaCO_3 , поэтому в разработанном ГОСТе [5] применять его не рекомендуют. Вместе с тем имеющиеся сведения о возможности феофитинизации хлорофилла в нейтральной и щелочной среде [38] не позволяют гарантировать сохранность пигментов при добавлении таких веществ. Это следует учитывать при интерпретации результатов анализа, полученных с использованием нейтрализаторов, особенно в больших количествах (10—30 мг на 1 см^2 , как предложено в работе О. И. Кобленц-Мишке [9]).

Экстракцию пигментов желательно проводить сразу же после фильтрации и фиксации проб жидким азотом, все другие варианты обработки проб приводят к феофитинизации [2]. При необходимости пробы хранят некоторое время. Наиболее совершенным способом считается замораживание и хранение при отрицательной температуре (-30°C) [21], а самым простым, но менее надежным — высушивание при комнатной температуре и хранение в бытовом холодильнике [47]. При любом способе хранения важно знать вероятные величины потерь, поэтому для каждой серии высушенных проб желательно иметь свежий материал в качестве контроля.

В замороженных пробах пигменты сохраняются удовлетворительно в течение 1—6 мес [21], а в высушенных они разрушаются на 16—30 % за 2 мес. [7, 8]. Общие потери за счет вы-

сушивания и последующего хранения могут составить до 50 % концентрации хлорофилла в свежих пробах [45]. Потери количества каротиноидов в сухих пробах больше, чем хлорофилла, что приводит к получению искаженных представлений о соотношении желтых и зеленых пигментов. По нашим наблюдениям, показатель этого соотношения — индекс E_{480}/E_{664} уменьшается в среднем на 20 % после высушивания пробы. Причиной таких различий может быть неустойчивость каротиноидов к воздействию внешних факторов [20].

Для более полного экстрагирования пигментов из растительного материала применяют растирание вручную, обработку ультразвуком, настаивание пробы в растворителе с последующим разрушением клеток или без такового, извлечение одним растворителем или смесью [34]. Наилучшим способом считается фиксация свежего материала жидким азотом с последующим гомогенизированием [2]. Значительные трудности возникают при извлечении пигментов из высушенных проб, состоящих из зеленых и сине-зеленых водорослей [13, 45]. Экстракт пигментов отделяют от осадка центрифугированием или фильтрованием через стеклянные шоттовские фильтры с соответствующими размерами пор. Фильтрование дает хорошие результаты, но поры быстро и необратимо забиваются взвесью. При центрифугировании важно избежать нагревания экстрактов, так как повышение температуры способствует разрушению пигментов и уменьшению скорости оседания взвешенных в растворе частиц. Режим работы центрифуги подбирают в зависимости от ее типа, устанавливая скорость вращения ротора от 4 до 8—9 тыс. об/мин [3, 9].

Первостепенное требование к экстрактам — отсутствие неспецифического поглощения света, возникающего за счет взвесей и растворимых окрашенных соединений, среди которых могут быть дериваты некоторых пигментов, как, например, фукоксантина [43]. Это поглощение контролируется измерением оптической плотности в крайней длинноволновой области видимого спектра на длине волны 750 нм. Абсолютно чистый раствор пигментов, т. е. с нулевой оптической плотностью или 100 %-ным пропусканием на этой длине волны очень трудно получить на природном материале. Допустимой считается величина, равная 0,005 в расчете на 1 см слоя раствора при оптимальной оптической плотности, составляющей, как известно, 0,2—0,8 в максимуме хлорофилла „а” [47]. При более высокой мутности раствора проба бракуется.

При вычислении концентраций пигментов рекомендуется из показаний прибора на всех длинах волн вычитать единую поправку на неспецифическое поглощение, равную оптической плотности, измеренной на длине волны 750 нм [5]. В более ранних рекомендациях [40] предлагалось для расчета каротиноидов вычитать утроенную величину оптической плотности, измеренную

на 750 нм, поскольку в области коротких длин волн, где находится максимум поглощения света желтыми пигментами, увеличивается светорассеяние. Однако на практике оказалось, что такая величина поправки слишком велика для каротиноидов и может привести к искажению концентраций, особенно при низком уровне оптических плотностей. Одной из причин этого может быть нарушение пропорциональности между поглощением света и концентрацией пигментов при значительной мутности раствора. Неспецифическое поглощение за счет взвешенных частиц можно уменьшить путем отстаивания экстракта в холодильнике, повторным центрифугированием, добавлением нескольких капель чистого растворителя (аcetона).

В качестве растворителя пигментов фитопланктона используют ацетон, этанол или метанол. Наиболее часто применяется ацетон, хотя лучшим экстрагентом считается метанол [45], особенно при анализе пигментов зеленых и сине-зеленых водорослей. Присущества и недостатки различных растворителей подробно изложены в работе [34].

Точность измерения оптической плотности зависит от концентрации пигментов в экстракте и особенностей их спектра поглощения. На участках узкой полосы максимума хлорофилла „а” (664—665 нм) и резкого спада общего поглощения в области максимума хлорофилла „b” (647 нм) увеличивается вероятность ошибок при измерении оптической плотности. Погрешность отсчета оптической плотности особенно сильно влияет на определение хлорофилла „b”, поскольку его содержание обычно невелико в сравнении с хлорофиллом „а”. В области максимума хлорофилла „с” (630 нм) поглощение меняется не так резко, как при 665 и 647 нм, но уровень оптической плотности здесь значительно меньше рекомендуемого оптимума. Поэтому важное значение имеет контроль градуировки прибора по длинам волн, точная их установка в процессе измерений, а также тщательное выполнение отсчетов оптической плотности. В случае обнаружения отклонений в градуировке прибора и невозможности их инструментального устранения допускаются измерения с помощью следующего приема. Оценивают положение максимума хлорофилла на приборе, находят разницу по сравнению с областью истинного максимума (664 нм в 90 %-ном ацетоне) и вводят эту поправку к отсчетам в сторону длинных или коротких волн в зависимости от установленного дефекта. Например, при сдвиге шкалы длин волн на 5 нм в коротковолновую область оптическую плотность измеряют не при 664, 647 и 630 нм, как рекомендовано, а при 659, 642 и 625 нм.

Для суждения о реальности получаемых данных можно рекомендовать сопоставление содержания пигментов с другими показателями продуктивности фитопланктона, например с биомассой или интенсивностью фотосинтеза. Признаком недостоверности мо-

гут быть очень низкие или крайне высокие относительные величины этих показателей. Наглядной характеристикой является также индекс E_{430}/E_{665} , который не должен быть меньше 1, поскольку теоретически оптическая плотность одних зеленых пигментов без каротиноидов на длине волны 430 нм выше, чем при 665 нм. Только в исключительных случаях, например после сильного подкисления фукоксантина, происходит образование дериватов, имеющих максимум поглощения в красной области спектра, что может привести к превышению оптической плотности при 665 нм по сравнению с 430 нм [43].

Важное значение имеет оценка продуктов превращения хлорофиллов (феофитины, феофорбиды, хлорофиллиды и др.), состав и соотношение которых значительно различаются в зависимости от условий в месте отбора проб [18]. В жизнеспособных клетках растений они не накапливаются, но в сестоне водоемов присутствуют практически всегда. Значительные количества феопигментов могут проявляться в процессе старения и отмирания водорослей или их выседания и переваривания зоопланктоном. Поскольку области спектральных максимумов феопигментов и хлорофилла совпадают, их количество нельзя определить точно в общем экстракте. В то же время присутствие дериватов мешает определению хлорофилла и искажает представления о фотосинтезирующей биомассе фитопланктона.

Удовлетворительное определение содержания всех феопигментов возможно только хроматографическими методами, которые, однако, сложны в исполнении и малодоступны из-за дефицитной и дорогостоящей аппаратуры. Для массовых анализов применяются спектрофотометрические методы, разработанные Лоренценом [29] и Моссом [36], позволяющие приблизительно оценить сумму феопигментов в общем экстракте. Эти методы основаны на учете изменений поглощения света экстрактом после подкисления в красном [29] или синем [36] максимумах хлорофилла. В методе Лоренцена [29] используется свойство хлорофилла уменьшать оптическую плотность при 665 нм в 1,7 раза в процессе превращения в феофитин под действием слабой кислоты (кислотный фактор). При более сложном составе феопигментов кислотный фактор не соответствует величине 1,7, поскольку удельные коэффициенты поглощения света даже для основных дериватов хлорофилла различаются более чем в 2 раза:

Хлорофилл	Хлорофиллид	Феофитин	Феофорбид	Источник
87,7	127	51,2	74,2	[31]
87,7	128	49,5	69,8	[30]
—	—	—	53,5	[46]

Методы Лоренцена и Мосса позволяют оценить приблизительные количества безмагнелиевых производных хлорофилла, тогда как доля бесфитофильных пигментов остается неизвестной. Однако неоднозначность данных о концентрации бесфитофильных пигментов [1, 15, 22] не дает основания игнорировать их роль в суммарном поглощении света общим экстрактом из сестоны.

Для определения феопигментов выбирают такую концентрацию кислоты, которая способствует достаточно быстрому превращению хлорофилла в феофитин без образования побочных продуктов [35]. При использовании слабой кислоты увеличивается продолжительность феофитинизации. При сильном подкислении возникает опасность получения неизвестных дериватов хлорофилла и продуктов окисления каротиноидов, в частности, главного каротиноида диатомовых — фукоксантина [43], поглощающих свет при 665 и 750 нм. Оптимальной для анализа феопигментов считается концентрация, равная $3 \cdot 10^{-3}$ м [43]. Иногда при подкислении экстракт необратимо мутнеет в результате образования стойкой эмульсии, что тоже препятствует получению достоверных результатов.

Сумма чистого хлорофилла „а“ и феопигментов, определяемая по методу Лоренцена, выше, чем концентрация хлорофилла „а“ по данным стандартного метода. Это завышение составляет 20—100 % концентрации феопигментов [14], хотя на основании удельных коэффициентов хлорофилла и феофитина должно составлять 59 % [4]. Несоответствие практических результатов с теоретически ожидаемыми связано со сложным составом дериватов и различиями их спектральных свойств.

Метод Лоренцена позволяет получить более точные результаты, чем метод Мосса, поскольку в красной области спектра не определение феопигментов не влияют каротиноиды. В то же время метод Мосса считается более чувствительным, так как интенсивность поглощения света пигментами в области 430 и 410 нм больше, чем при 665 нм [3].

Концентрации феопигментов, измеряемые спектрофотометрически в общем экстракте, следует считать ориентировочными, поскольку они отличаются от результатов, полученных более точными хроматографическими методами [10, 32, 37].

Помимо зеленых пигментов, значительная роль в планктоне принадлежит каротиноидам. Они содержатся как в фито-, так и зоопланктоне и весьма разнообразны по составу и спектральным свойствам у разных групп организмов [20], что затрудняет их количественное определение в смешанном экстракте. Первая попытка такого анализа каротиноидов планктона предпринята Ричардсом и Томпсоном [42], которые наряду с хлорофиллом оценивали общие растительные и животные каротиноиды. Оптическую плотность измеряли при 480 и 510 нм, а концентрации пигментов рассчитывали по осредненным коэффициентам удель-

ного поглощения, величины которых были близки к полученным для β -каротина и астацина (пигмента ракообразных). С появлением более точных хроматографических методов было показано, что водоросли содержат каротиноиды, спектрально сходные с пигментами животных, а водные беспозвоночные имеют общие с водорослями желтые пигменты [48]. Поэтому данные об уровне содержания каротиноидов, полученные по Ричардсу и Томпсону [42], трудно интерпретировать.

Большее распространение получил разработанный Парсоном и Стриклендом [40] метод определения суммарного содержания каротиноидов по оптической плотности экстракта на длине волны 480 нм с использованием в расчетах удельных коэффициентов поглощения света, близких к таковым β -каротина или фукоксантина в зависимости от систематической принадлежности водорослей: соответственно 250 л/(г·см) — для зеленых и сине-зеленых и 100 л/(г·см) — для диатомовых, золотистых, криптофитовых и динофитовых. Однако при этом неясно, как рассчитывать концентрации каротиноидов в фитопланктоне смешанного состава.

В связи с тем что спектрофотометрический анализ общего экстракта не дает удовлетворительных результатов определения абсолютного содержания каротиноидов, в качестве показателя их доли в сравнении с хлорофиллом применяют отношение оптических плотностей в области наиболее интенсивного поглощения света этими пигментами — 480 и 664 нм (E_{480}/E_{664}) [12, 19, 24]. Однако следует иметь в виду, что индекс E_{480}/E_{664} зависит не только от концентрации каротиноидов и хлорофилла, но также от содержания феопигментов, состава планктона, способа консервации проб и др. факторов [16]. Показана его связь с интенсивностью солнечной энергии и с обеспеченностью водорослей минеральным азотом [39, 49]. Этот индекс является интегральной характеристикой всего сестона и не может служить однозначным индикатором физиологического состояния фитопланктона. То же относится и к другим подобным индексам — E_{430}/E_{665} и E_{430}/E_{480} , используемым в гидробиологических исследованиях.

Таким образом, при всей простоте и доступности спектрофотометрический анализ общего экстракта планктона имеет неустраняемый недостаток, заключающийся в невозможности получения истинных концентраций определяемых пигментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бекасова О. Д., Коновалов Б. В., Демидов А. А. Влияние продуктов деструкции хлорофилла на точность определения хлорофилла „а” спектрофотометрическим методом // Экосистемы Балтики в мае—июне 1984 г. М., 1987.

2. Берсенева Г. П. Феофитиназация хлорофилла в процессе экстракции пигментов из морских одноклеточных водорослей // *Экология моря*. Киев, 1988. № 28.
3. Бульон В. В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л., 1983.
4. Ведерников В. И., Коновалов Б. В., Кобленц-Мишке О. И. Результаты применения спектрофотометрического метода определения феофитина „а“ в пробах морской воды // *Формирование биологической продуктивности и донных осадков в связи с особенностями циркуляции вод в юго-восточной части Атлантического океана*. М., 1973. Т. 95.
5. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла „а“. ГОСТ 17.1.04.02.90. М., 1990.
6. Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина О. М. Большой практикум по физиологии растений. М., 1975.
7. Елизарова В. А. О хранении фильтров с сухим осадком фитопланктона // *Биология внутренних вод*: Информ. бюл. Л., 1983. № 57.
8. Ковалевская Р. З. Содержание хлорофилла в планктоне // *Общие основы изучения водных экосистем*. Л., 1979.
9. Кобленц-Мишке О. И. Экстрактный и безэкстрактный методы определения фотосинтетических пигментов в пробе // *Современные методы количественной оценки распределения морского планктона*. М., 1983.
10. Нестеренко Б. В. Методы определения активных и неактивных форм хлорофилла „а“ в планктоне // *Особенности развития фитопланктона в рыбохозяйственных водоемах различного типа*. Л., 1987. Вып. 265.
11. Пырина И. Л. Предварительные итоги применения спектрофотометрического метода для определения пигментов пресноводного фитопланктона // *Биологические аспекты изучения водохранилищ*. М.; Л., 1963.
12. Пырина И. Л., Сигарева Л. Е. Содержание пигментов фитопланктона в Рыбинском водохранилище в различные по гидротеморологическим условиям годы (1972—1976 гг.) // *Биология и экология водных организмов*. Л., 1986.
13. Сигарева Л. Е. О влиянии характера механического разрушения фитопланктона на степень экстрагирования его пигментов // *Биология внутренних вод*: Информ. бюл. Л., 1974. № 24.
14. Сигарева Л. Е. Об измерении потенциально активного хлорофилла в фитопланктоне // *Биология внутренних вод*: Информ. бюл. Л., 1975. № 25.
15. Сигарева Л. Е. О содержании бесфитовых пигментов в фитопланктоне // *Биология внутренних вод*: Информ. бюл. Л., 1986. № 69.
16. Сигарева Л. Е., Ляшенко О. А. Пигментные характеристики фитопланктона оз. Неро // *Современное состояние экосистемы оз. Неро*. Рыбинск, 1991.
17. Сиренко Л. А., Курейшевич А. В. Определение содержания хлорофилла в планктоне пресных вод: Методические рекомендации. Киев, 1982.
18. Brown S. R. Absorption coefficients of chlorophyll derivatives // *J. Fish. Res. Board Canada*. 1968. Vol. 25, N 3.
19. Burkholder P. R., Burkholder L. M., Rivero J. A. Chlorophyll *a* in some corals and marine plants // *Nature*. London. 1959. Vol. 183, N 4671.
20. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. London; New York; San Francisco, 1976. Vol. 1, N 2.
21. Gleskes W. W. C., Krady G. W., Nontji A., Setlapermana D., Sutomo. Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints // *Neth. J. Sea Res.* 1988. Vol. 22, N 2.
22. Gowen R. J., Tett P., Wood B. J. B. Changes in the major dihydroporphyrin plankton pigments during the spring bloom of phytoplankton in two Scottish lochs // *J. mar. Biol. Ass. U. K.* 1983. Vol. 63.

23. Hallegraf J. M. Pigment diversity freshwater phytoplankton. I. A comparison of spectrophotometric and chromatographic methods // *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 1976. Vol. 61, N 2.
24. Heaney S. I., Smyly W. J. P., Talling J. F. Interactions of physical, chemical and biological processes in depth and time within productive english lake during summer stratification // *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 1986. Vol. 71, N 4.
25. Jacobsen T. R. Comparison of chlorophyll "a" measurements by fluorometric, spectrophotometric and high pressure liquid chromatographic methods in aquatic environments // *Arch. Hydrobiol.* 1982. N 16.
26. Jeffrey S. W., Hymphrey G. H. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls "a", "b", "c₁" and "c₂" in higher plants, algae and natural phytoplankton // *Biochem. and Physiol. Pflanz.* 1975. Vol. 167, N 2.
27. Lenz J., Fritsche P. The estimation of chlorophyll a in water samples: a comparative study on retention in a glass — fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods // *Ergeb. Limnol.* 1980. N 14.
28. Long E. B., Cooke G. D. A quantitative comparison of pigment extraction by membrane and glass-filters // *Limnol., Oceanogr.* 1971. Vol. 16, N 6.
29. Lorenzen C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations // *Limnol., Oceanogr.* 1967. Vol. 12 N 2.
30. Lorenzen C. J., Downs N. J. The specific absorption coefficients of chlorophyllide a and pheophorbide a in 90 % acetone, and comments on the fluorometric determination of chlorophyll and pheopigments // *Limnol., Oceanogr.* 1986. Vol. 31, N 2.
31. Lorenzen C. J., Jeffrey S. W. Determination of chlorophyll in seawater // UNESCO technical papers in marine sciences. Paris, 1980. N 35.
32. Mantoura R. F. C., Llewellyn C. A. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography // *Analytica Chimica Acta.* 1983. Vol. 151.
33. Marker A. F. H., Nusch E. A., Ral H., Riemann B. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations // *Ergeb. Limnol.* 1980. N 14.
34. Marker A. F. H., Sally Jinks. The spectrophotometric analysis of chlorophyll a and pheopigments in acetone, ethanol and methanol // *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 1982. Vol. 16.
35. Moed J. R., Hallegraeff G. M. Some problems in the estimation of chlorophyll a and pheopigments from pre- and post-acidification spectrophotometric measurements // *Int. Rev. ges. Hydrobiol.* 1978. Vol. 63, .
36. Moss B. A spectrophotometric method for the estimation of percentage degradation of chlorophylls to pheopigments in extracts of algae // *Limnol., Oceanogr.* 1967. Vol. 12, N 2.
37. Nusch E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination // *Ergebn. Limnol.* 1980. N 14.
38. Owenz T. G., Falkowski P. G. Enzymatic degradation of chlorophyll "a" by marine phytoplankton in vitro // *Phytochemistry.* 1982. Vol. 21, N 5.
39. Paerl H. W., Tueker J., Bland P. T. Carotenoid enhancement and its role in maintaining bluegreen algal (*Microcystis aeruginosa*) blooms // *Limnol., Oceanogr.* 1983. Vol. 28, N 5.
40. Parsons T. R., Strickland J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids // *J. Mar. Res.* 1963. Vol. 21, N 3.
41. Ral H. Some problems in determination of photosynthetic planktonic pigments and their decomposition products // *Ergebn. Limnol.* 1980. N 14.
42. Richards F. A., Thompson T. G. The estimation and characterization of plankton population by pigment analyses. II. A spectrophotometric method to the estimation of plankton pigments // *J. Mar. Res.* 1952. Vol. 11, N 2.
43. Riemann B. Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton // *Limnol., Oceanogr.* 1978. Vol. 23, N 5.

44. Rott E. Spectrophotometric and chromatographic chlorophyll analysis: comparison of results and discussion of the trichromatic method // *Ergebn. Limnol.* 1980. N 14.
45. Sand-Jensen K. A comparison of chlorophyll *a* determinations of unstored and stored plankton filters extracted by methanol and acetone // *Vatten.* 1976. Vol. 32, N 4.
46. Shuman F. R., Lorenzen C. J. Quantitative degradation of chlorophyll by a marine herbivore // *Limnol., Oceanogr.* 1975. Vol. 20, N 4.
47. UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in sea-water // *Monographs on oceanographic methodology.* Paris, 1966. N 1.
48. Vincent M. Rôles et transformations des pigments caroténoïdes dans les réseaux trophiques marins // *La mer.* 1988. T. 26, N 4.
49. Watson R. A., Osborne P. L. An algal pigment ratio as an indicator of nitrogen supply to phytoplankton in three Norfolk broads // *Freshwater Biol.* 1979. Vol. 9, N 6.

Г. А. Корнюшенко

Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПИГМЕНТОВ ФИТОПЛАНКТОНА

Рассмотрены методы хроматографии, применяемые для анализа растительных пигментов, их основные принципы, преимущества и недостатки. Характеризуются особенности адсорбентов и растворителей. Обсуждаются трудности и перспективы хроматографического определения пигментного состава фитопланктона.

Природные сообщества водорослей включают большое разнообразие видов с богатым набором пигментов. Их изучение весьма важно для понимания функционирования первичного звена в трофической цепи и экосистемы водоема в целом. Однако это невозможно без хроматографического разделения пигментов. Применение хроматографии необходимо и для калибровки более простых методов, которые используются гидробиологами при массовых определениях содержания хлорофилла в смеси с другими пигментами, а также при трактовке полученных результатов.

Хроматографический метод позволяет разделять исследуемые вещества, отделять их от нежелательных примесей и получать пигменты в чистом виде. Высокая точность количественного определения обеспечивается соблюдением двух основных правил: 1 — предотвращение каталитического разрушения пигментов в процессе разделения; 2 — при расчете их концентраций правильный выбор удельных коэффициентов поглощения, значения которых для различных растворителей и длин волн могут сильно расходиться. Последнее особенно касается каротиноидов, наиболее разнообразных и недостаточно изученных пигментов водорослей (см. таблицу). Удельные коэффициенты экстинкции хлорофиллов контролируются чаще, и их величины применительно к изучению водорослей [43] более стандартизированы.

Методы хроматографического разделения пигментов разработаны на высших растениях и культурах водорослей, имеющих сравнительно небольшой набор хлорофиллов и каротиноидов. Состав

Значения удельного показателя поглощения света (ϵ) каротиноидами

Пигмент	Растворитель	ϵ	$\lambda_{\text{макс}}$	Источник
α -каротин	Хлороформ	2420	456	29
	Петролейный эфир	2800	445	28
β -каротин	Гексан	2592	453	
	Петролейный эфир	2592	453	
	Хлороформ	2396	465	
	Этанол	2620	453	
	Ацетон	2500	—	56
γ -каротин	Гексан	2760	462	28
	Петролейный эфир	3100	462	
	То же	3120	440	
ϵ -каротин	Этанол	2800	442	
Лютеин-5,6-эпоксид	"	2550	443	
Виолаксантин	"	2550	445	
Лютеин	"	2350	446	29
Антераксантин	"	2540	450	28
Зеаксантин	"	2243	439	
Неоксантин	Петролейный эфир	2158	456	
Эхиноенон		2200	466	
Кантаксантин	Пиридин	1690	498	25
Астацин		1620	453	37
Фукоксантин	Ацетон	2350	445	28
Дээпоксинеоксантин (троллеин)	Этанол			
Диадиноксантин	Ацетон	2000	449	37
Диатоксантин	То же	2000	453	36
Перидинин	Этанол	1325	472	56
	Ацетон	840	466	37
	"	1500	—	28
α -криптоксантин	Гексан	2625	445	
β -криптоксантин	Петролейный эфир	2386	452	
Осциллоксантин	Пиридин-метанол	750	—	25

Примечание. ϵ — поглощение света 1 %-ным раствором пигмента при толщине слоя 1 см на заданных длинах волн (λ).

пигментов у фитопланктона значительно богаче и более лабилен. Разная природа отдельных групп пигментов водорослей делает невозможным их разделение на одной хроматограмме. Чтобы получить реальное представление о пигментах фитопланктона, необходимо применять модификации существующих методик хроматографии. Такие работы появились сравнительно недавно [1, 5, 6, 9, 17, 34, 35, 37].

В основу хроматографических методов, используемых при анализе растительных пигментов, положены принципы адсорбционной и распределительной хроматографии. Адсорбционная хроматография связана с проявлением сил Ван-дер-Ваальса, электростатических сил и сил заряда. При этом под адсорбцией понимается накопление растворенных веществ на поверхности раздела

жидкой и твердой фаз. В процессе разделения веществ происходит непрерывная адсорбция и десорбция. Скорость движения веществ определяется равновесием между их растворимостью в растворителе и способностью адсорбироваться в центрах адсорбции. Всякое вещество может быть охарактеризовано по степени его сродства к адсорбенту, что определяется природой адсорбента и растворителя. Отличительной особенностью адсорбционной хроматографии является непостоянство значений R_f (отношения „радиус/фронт” — расстояния от старта до центра пятна, деленного на расстояние от старта до фронта), которые зависят от наличия нейтральных липидов в растительном экстракте, размеров частиц адсорбента и высоты подъема растворителя. Распределительная хроматография основана на распределении разделяемых веществ между двумя несмешивающимися жидкостями, одна из которых (неподвижная, стационарная, фаза) удерживается подходящим, по возможности инертным, твердым носителем, а другая (подвижная фаза) транспортирует вещества через стационарную фазу. Вещества отделяются друг от друга благодаря различной скорости движения по хроматограмме вследствие различных коэффициентов распределения между фазами. В неподвижной фазе вещества более растворимы, чем в подвижной. Положение пятен на хроматограмме, зависящее от скоростей движения вещества и растворителя, характеризуется величиной R_f . Ее значение в распределительной хроматографии постоянно.

Адсорбенты классифицируются по их адсорбционной емкости [27]. У органических адсорбентов адсорбционная емкость невелика, и при их использовании полосы пигментов получаются широкими и размытыми. Неорганические адсорбенты, имеющие значительно большее число адсорбционных центров на единицу массы вещества, характеризуются более высокой адсорбционной емкостью по сравнению с органическими. К слабым адсорбентам относятся сахароза, целлюлоза, крахмал, тальк, карбонат натрия, к средним — карбонат кальция, фосфаты кальция и магния, окись магния, гидрат окиси кальция, к сильным — активированные силикат магния, окись алюминия, активированный древесный уголь, кизельгур. Высокая емкость поглощения неорганических адсорбентов не исключает проявления ими в процессе хроматографирования каталитической активности, приводящей к изомеризации и окислению пигментов. Для предотвращения этого предлагают различные приемы: добавление к адсорбенту в качестве антиоксиданта нейтрализованной аскорбиновой кислоты с использованием свежеприготовленных слоев, ускорение элюции пигментов с сырого слоя пластинки [29].

В адсорбционной хроматографии существенную роль играет активация адсорбента обезвоживанием. Молекулы воды, легко

связываясь с адсорбентом, блокируют его активные центры, что ухудшает качество разделения пигментов.

Большое значение имеют размеры частиц адсорбента. Чем они мельче, тем активнее слой, но тем медленнее движение фронта растворителей. Самые мелкие частицы и наиболее крупные ухудшают разделение. Для достаточно быстрого и качественного разделения необходимо выбрать оптимальные размеры частиц [58].

Разделение смеси веществ производится обычно системой растворителей, состоящей из двух-трех, иногда до пяти, компонентов. От природы растворителя и адсорбента зависит скорость передвижения веществ на хроматограмме. При выборе растворителя для адсорбционной хроматографии пользуются одним из известных элюотропных рядов, в которых растворители расположены в порядке увеличения их элюирующей способности [57]. Сила элюции пропорциональна диэлектрической проницаемости и соответственно полярности растворителя.

При выборе адсорбентов учитывают свойства разделяемых веществ, растворителя и взаимодействие между ними. В самой общей форме определяют степень гидрофильности или гидрофобности вещества. Чем больше в молекуле пигмента двойных связей и функциональных групп, тем сильнее он адсорбируется. Среди каротиноидов наиболее сильно адсорбируются γ -каротин и ликопин-соединения с открытым кольцом [15]. Благодаря наличию функциональных групп ксантофиллы адсорбируются сильнее каротинов. При этом полярные заместители действуют в следующем порядке снижения: $R - O, = O, - OH$ [50]. Кроме того, существует общее правило: если вещество слабо адсорбируется, необходимо использовать активные адсорбенты, если сильно — малоактивные.

При подборе растворителя или смеси растворителей следует руководствоваться принципами, установленными еще М. С. Цветом [12]: способность вещества адсорбироваться на одном и том же адсорбенте из разных растворителей увеличивается по мере уменьшения растворимости. Пигмент, полностью адсорбирующийся из данного растворителя, не извлекается им из комплекса с адсорбентом. Если вещество обладает слабым сродством к адсорбенту, то используют слабополярные растворители, стоящие в начале элюотропного ряда, если же сродство сильное, то используют сильнополярные растворители.

В адсорбционной хроматографии пигментов преобладающим компонентом смеси растворителей является, как правило, неполярный. Соотношение полярных и неполярных растворителей определяется типом пигментов. Так, при разделении каротиноидов берут более высокое содержание полярного растворителя относительно неполярного, чем при разделении хлорофиллов.

В распределительной хроматографии, в которой в качестве носителя используются органические (целлюлоза, сахароза, маннит) и неорганические (кieselгур, силикагель) адсорбенты со всевозможными добавками, растворители подбирают для обеих жидких фаз. В качестве неподвижной фазы берут воду и некоторые другие полярные растворители — ацетон, метанол. Количество растворителя неподвижной фазы должно быть точно определено. Чтобы избавиться от избытка растворителя, пропитанный им слой подсушивается на воздухе или при непродолжительном выдерживании в термостате. В состав подвижной фазы входит менее полярный органический растворитель с небольшими добавками полярного.

При хроматографировании способом обращенной фазы [21, 22] носитель, обычно кieselгур, импрегнируют (пропитывают) липидами, такими, как парафин, жиры, масло. Подвижной фазой при этом служит система растворителей высокой полярности, состоящая главным образом из ацетона, метанола и воды. Последовательность распределения пигментных зон при этом обратная той, которая имеет место при адсорбционной хроматографии.

Обратить фазы можно без импрегнирования, подбирая растворители. Для этого удобен тонкий слой полиамида, предложенный Эггером и Войтом [23], который занимает промежуточное положение по полярности и может быть применен для разделения как сильно полярных, так и неполярных соединений. При использовании неполярной системы растворителей — изоктан—метанол—метилэтилкетон (80 : 10 : 10), полиамид выступает как полярная фаза. Если же подвижной фазой служит система полярных растворителей — метилэтилкетон—метанол—вода (30 : 30 : 10), полиамид относительно менее полярный, и тогда имеет место обращенная фаза распределительной хроматографии. При этом насыщенный спиртом полиамид является не просто инертным носителем стационарной жидкой фазы, а принимает активное участие в хроматографическом процессе. Принцип распределения между жидкими фазами здесь сочетается с адсорбционными явлениями, свойственными лишь полиамиду.

Более подробно с теоретическими основами адсорбционной, распределительной хроматографии и хроматографией в обращенной фазе можно ознакомиться в специальных работах [24, 40, 49, 51].

При идентификации пигментов с известными спектральными характеристиками сравнивают спектры их элюатов с описанными в литературе. Кроме того, учитывают положение пигмента на хроматограмме, его порядковый номер в последовательности полос, что тоже известно.

Для количественного определения измеряется оптическая плотность элюата на длине волны, соответствующей максимуму

поглощения, для которой получен удельный коэффициент экстинкции пигмента. Расчет концентраций производится по формуле

$$C = \frac{E_{\lambda}}{l \epsilon} K,$$

где C — концентрация пигмента, E_{λ} — оптическая плотность раствора на длине волны λ , ϵ — удельный коэффициент экстинкции, l — толщина кюветы спектрофотометра, K — множитель, учитывающий соотношение объемов элюата, экстракта, нанесенного на хроматограмму, общего количества экстракта и отфильтрованной суспензии водорослей.

Первым вариантом хроматографического метода была колоночная хроматография, разработанная М. С. Цветом в 1904 г. [12], которая позволила установить множественность форм хлорофиллов и каротиноидов в зеленом листе. Однако трудоемкость метода в сочетании с другими недостатками (необходимость большой навески, предварительное ее высушивание, длительное хроматографирование) стали препятствием к его широкому распространению. В настоящее время колоночная хроматография используется лишь в препаративных целях.

Появившиеся позднее методы бумажной хроматографии (БХ) [18] и тонкослойной хроматографии (ТСХ) [4, 44, 45, 48] основаны на использовании адсорбента в виде как бы „открытой“, развернутой на плоскости, колонки. При этом обеспечивается возможность работы в микропрепаративном масштабе, значительно упрощается процедура и увеличивается скорость разделения веществ.

Бумажная хроматография — самая доступная и удобная для применения, поскольку в ней используется готовый коммерческий адсорбент. Стандартные характеристики хроматографической бумаги гарантируют хорошую воспроизводимость данных, а ее слабая адсорбционная емкость — относительную стабильность пигментов. Однако узкий интервал характеристик адсорбции у бумаги разных марок не позволяет обеспечить селективность метода, необходимую для разделения структурных изомеров каротиноидов. При разделении пигментов, как липофильных веществ, полосы на бумаге получаются широкие и не имеют четких границ, поэтому элюция с хроматограмм каждого из них относительно длительная и требует сравнительно большого объема растворителя.

Тонкослойная хроматография, в которой применяется нанесенный на подложку (обычно стекло) тонкий слой адсорбента, лишена недостатков бумажной хроматографии [7]. Неограниченные возможности в выборе адсорбентов и в составлении смесей из них позволяют получить слои с любыми адсорбционными харак-

теристиками, с чем связана в ряде случаев высокая селективность метода ТСХ. Время разделения пигментов 20—40 мин. Благодаря большой адсорбционной емкости полосы пигментов при разделении получаются узкими и четкими, что позволяет быстро снимать порошок с пигментами с еще не высохшего слоя и предотвращать окислительное разрушение пигментов. Метод характеризуется высокой чувствительностью (0,1—0,005 мкг) и точностью (около 5 %) и нашел успешное применение при анализе пигментов водорослей [34, 35].

Еще более высокую разрешающую способность имеет жидкостная хроматография (ЖХ), которую можно рассматривать как аналог колоночной хроматографии под высоким давлением или как модификацию тонкослойной [3, 10, 13, 33]. При этом используются очень тонкие колонки (1—3 мм) адсорбента, подвергнутого специальной химической обработке. В качестве адсорбента берут силикагель, карбонат цинка, окись магния и некоторые другие. Механизм разделения основан на слабых гидрофобных силах, поэтому исключается деградация пигментов. Многократно осуществляемое автоматическое рехроматографирование позволяет с помощью коллектора отбора фракций получать растворы отдельных пигментов в необходимом количестве. Благодаря сканирующему устройству записывается величина поглощения индивидуальных веществ при заданной длине волны. Метод позволяет разделять хлорофиллы и продукты их деградации на одной хроматограмме. Не всегда удается отделить все структурные изомеры каротиноидов [16], хотя принципиально это возможно путем варьирования подвижной фазы. Большим преимуществом является высокая чувствительность метода, позволяющая улавливать 10—20 пг вещества, точность — 1,5 % и оперативность — для обработки одной пробы требуется 20 мин [46].

В отдельных случаях данные жидкостной хроматографии могут быть завышены из-за несовпадения базовой линии на скане. Бывают помехи из-за сильных шумов и дрейфа нулевой линии самописца, в связи с чем полученные результаты рекомендуется контролировать методом тонкослойной хроматографии. Поэтому некоторые авторы считают, что для анализа фотосинтетических пигментов все же предпочтительна тонкослойная хроматография [41].

Тем не менее высокие показатели селективности, чувствительности, точности и скорости проведения анализа заставляют признать преимущество жидкостной хроматографии перед другими хроматографическими методами. За рубежом метод ЖХ успешно применяют при анализе пигментов фитопланктона, в том числе на борту судна [14, 26]. В нашей стране реальные возможности для этого пока отсутствуют. Отечественный хроматограф „Миллихром” не пригоден для работы с веществами, поглощающими

свет в видимой области спектра, а зарубежные приборы малодоступны.

Большинство методик разделения хлорофиллов, каротиноидов и продуктов их превращений представлены в обзоре Лихтенталера [40]. Специальные работы посвящены изоляции, разделению, идентификации и количественному определению каротиноидов [20, 38, 39]. Для разделения изомеров каротиноидов предложен оригинальный вариант адсорбционной хроматографии на слое „В” [29], в котором предусмотрено омыление хлорофилла на содержащих щелочь пластинках, что позволяет избежать перекрытия каротиноидов хлорофиллом. Метод был модифицирован применительно к отечественным адсорбентам [8] и с успехом используется уже в течение 20 лет.

Серией работ Хагера и Странского [30—32, 53—55] было установлено, что метод разделения каротиноидов на щелочных пластинках [29] пригоден для определения основных, вторичных каротиноидов и их эфиров, содержащихся в клетках разных отделов водорослей. Преимущества этой методики [29] перед всеми существующими послужили основанием для ее использования при изучении каротиноидов фитопланктона [5, 6]. К сожалению, она не может быть применена для определения каротиноидов перидиниевых водорослей, так как основной их пигмент — перидинин — на щелочных пластинках разрушается [6, 42, 52]. Для изолирования перидинина из экстракта нужна другая методика. В качестве отправной точки может быть рекомендована хроматографическая система, предложенная Лоблихом и Смитом [42], но в этом случае надо перейти от колонки к тонкому слою.

Гидрофильные фикобилиновые пигменты, свойственные только водорослям, требуют совершенно особых методов анализа, на которых в данном разделе нет возможности остановиться. С ними можно ознакомиться в специальных работах [2, 11, 19].

Хроматографические методы открывают большие возможности изучения пигментов водорослей в различных направлениях. Это влияние факторов внешней среды на состав и соотношение пигментов; их динамика в ходе сукцессии сообществ водорослей; метаболизм ксантофиллов, способных к светоиндуцированным превращениям, известным под названием „виолаксантиновый и ди-адиноксантиновый цикл”; сравнительное изучение пигментного состава водорослей разных таксонов с целью хемосистематического анализа. Необходимо шире использовать такие методы в исследованиях экологии и продуктивности фитопланктона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берсенева Г. П., Финенко З. З. Количественное определение хлорофиллов „а” и „с” в морских планктонных водорослях при помощи бумажной хроматографии // *Океанология*. 1975. Т. 15, вып. 1.

2. Биохимия синезеленых водорослей. Киев, 1978.
3. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М., 1988.
4. Измайлов Н. А., Шрайбер М. С. Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармацевтике // Фармация. 1938. Т. 3, № 1.
5. Кобленц-Мишке О. И., Семенова М. А. Пигменты фитопланктона мезотрофных и эвтрофных районов тропической пачифики // Тр. Ин-та океанол. АН СССР. 1975. Т. 102.
6. Корнюшенко Г. А., Ведерников В. И., Кобленц-Мишке О. И., Коновалов Б. В. Результаты применения метода ТСХ для определения содержания каротиноидов в фитопланктоне Черного моря // Экосистемы пелагиали Черного моря. М., 1980.
7. Корнюшенко Г. А., Попова И. И. Сравнительная характеристика методов бумажной и тонкослойной хроматографии каротиноидов зеленого листа // Физиол. раст. 1979. Т. 17, вып. 6.
8. Корнюшенко Г. А., Сапожников Д. И. Методика определения каротиноидов зеленого листа с помощью тонкослойной хроматографии // Методы комплексного изучения фотосинтеза. Л., 1969.
9. Нестеренко Б. В. Метод определения активных и неактивных форм хлорофилла "а" в фитопланктоне // Сб. тру. Гос. НИОРХ. Л., 1987. № 265.
10. Основы жидкостной хроматографии. М., 1973.
11. Сиренко Л. А. Определение качественного состава и количества билихромоптереновых пигментов. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев, 1975.
12. Цвет М. С. Хлорофиллы в растительном и животном мире. Варшава, 1910.
13. Basic liquid chromatography. Palo Alto. 1978.
14. Bedigare R. R., Kennicutt J. J., Brooks J. M. Rapid determination of chlorophylls and their degradation products by high performance liquid chromatography // Limnol., Oceanogr. 1985. Vol. 30, N 2.
15. Bolliger H. R., König A. Vitamine, einschliesslich Carotinole, Chlorophyll und biologische active Chinone // Dünnschicht-Chromatographie. Berlin; Heidelberg; N. Y., 1967.
16. Braumann T., Grimme L. H. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids // Biochem. Biophys. Acta. 1981. Vol. 637, N 1.
17. Carreto J. I., Catoggio J. A. An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricornutum*: possible application to other marine algae // Mar. Biol. 1977. Vol. 40, N 1.
18. Consden R., Gordon A., Martin A. I. P. Qualitative analyses of proteins: a partition chromatographie method using paper // Biochem. J. 1944. Vol. 38.
19. Czygan F. C. Pigments in Plants. Stuttgart N. Y.; 1980.
20. Davies B. H. Analysis of carotenoid pigments // Chemistry and biochemistry of plant pigments. L., 1976. Vol. 2.
21. Egger K. Dünnschichtchromatographie der Chloroplastenpigmente // Planta. 1962. Bd 58, H. 6.
22. Egger K. Dünnschicht-Verteilungs-Chromatographie der Plastidenpigmente // Chrom. Symp. II. Soc. Belge Sci. Pharm. s. I. 1963.
23. Egger K., Volgt H. Carotinoidtrennung an Polyamid—Dünnschichten // Z. Pflanzenphysiol. 1965. Bd 53, N 1.
24. Engelhardt H. Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie. Berlin, 1975.
25. Foppen F. H. Tables for the identification of carotenoid pigments // Chrom. Rev. 1971. Vol. 14.
26. Girandiere I. Application de la HPLC aux etides de la microcouche de surface: relation entre l'accumulation du materiel vegetal et les changements de composition pigmentaire // Oceans. 1987. Vol. 13, N 4—5.
27. Goodwin T. W. Carotenoids // Modern methods of plant analysis. Heidelberg, 1955. Vol. 3.

28. Goodwin T. W. Distribution of carotenoids // Chemistry and biochemistry of plant pigments. L.; N. Y.; San Francisco, 1976. Vol. 1.
29. Hager A., Meyer-Bertenrath T. Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schicht-chromatographischer Methoden // Planta. 1966. Bd 69, N 3.
30. Hager A., Stransky H. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen I. Methoden zur Identifizierung der Pigmente // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd 71, H. 2.
31. Hager A., Stransky H. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen. III. Grünalgen // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd 72, H. 1.
32. Hager A., Stransky H. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen. V. Einzelne Vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phaeophyceae // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd 73, H. 1.
33. HPLC of small molecules: a practical approach. Oxford, 1986.
34. Jeffrey S. W. Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae // Biochem. Biophys. Acta. 1968. Vol. 162.
35. Jeffrey S. W. Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography // Mar. Biol. 1974. Vol. 26.
36. Jeffrey S. W., Haxo F. T. Photosynthetic pigments of symbiotic dinoflagellates (Zooxanthellae) from corals and clams // Biolog. Bul. 1968. Vol. 135, N 1.
37. Jensen A., Sakshaug E. Studies on the phytoplankton ecology of the Trondheimsfjord. II. Chloroplast pigments in relation to abundance and physiological state of phytoplankton // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1973. Vol. 11, N 2.
38. Liaaen-Jensen S. Isolation reactions // Carotenoids. Basel, 1971.
39. Liaaen-Jensen S., Jensen A. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues // Methods Enzymol. 1971. Vol. 23.
40. Lichtenthaler H. K. Lipids // CRC Handbook of Chromatography. Boca Raton, 1984. Vol. 2.
41. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. 1987. Vol. 148.
42. Loeblich A. R., Smith V. E. Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *Cyrodinium resplendens* // Lipids. 1968. Vol. 3, N 1.
43. Lorenzen C. J., Jeffrey S. W. Determination of chlorophyll in seawater // UNESCO technical papers in marine science. Paris, 1980. N 35.
44. Meinhard J. E., Hall N. F. Surface chromatography // Anal. Chem. 1949. Vol. 21.
45. Miller J. M., Kirchner J. C. Chromatostrips for identifying constituents of essential oils // Anal. Chem. 1953. Vol. 25.
46. Sartory D. P. The determination of algal chlorophyllous pigments by high performance liquid chromatography and spectrophotometry // Water. Res. 1985. Vol. 19, N 5.
47. Schanz F., Ral H. Extract preparation and comparison of fluorimetric, chromatographic (HPLC) and spectrophotometric determinations of chlorophyll a // Arch. Hydrobiol. 1988. Vol. 112, N 4.
48. Šesták Z. Thin-layer chromatography of chlorophylls // Photosynthetica. 1967. N 1.
49. Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to modern liquid chromatography. N. Y., 1974.
50. Stahl E. Neue Anwendungsgebiete der Dünnschicht-Chromatographie // Angew. Chem. 1961. Vol. 73, N 1.
51. Stahl E. (Шталь Э.) Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
52. Strain H. H., Manning W. M., Hardin G. Xanthophylls and carotens of diatoms, brown algae, dinoflagellates and sea anemones // Biol. Bull. 1944. Vol. 86, N 1.

53. Stransky H., Hager A. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen. II. *Xanthophyceae* // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd. 71, H. 2.
54. Stransky H., Hager A. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen. IV. *Cyanophyceae* und *Phodophyceae* // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd 72. H. 1.
55. Stransky H., Hager A. Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cyclus in verschiedenen Algenklassen. VI Chemosystematische Betrachtung // Arch. Mikrobiol. 1970. Bd 73, H. 4.
56. Strickland J. D. H. Production of organic matter in the primary stages of the marine food chain // Chemical oceanography L.; N. Y., 1965. Vol. 1.
57. Trappe W. Die Trennung von biologischen Fettstoffen aus ihren natürlichen Gemischen durch Anwendung von Adsorbtionssäulen // Biochem. Z. 1940. Vol. 30.
58. Zechmeister L., Cholnoky L. V. Principles and practice of chromatography. L., 1943.

А. Д. Апонасенко, **Ф. Я. Сидько**, В. А. Васильев

Институт биофизики СО РАН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ ХЛОРОФИЛЛА ФИТОПЛАНКТОНА ПО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫМ СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ СВЕТА

Рассмотрены возможности дифференциальной спектроскопии при безэкстракционном определении концентраций хлорофилла в пробах природных вод с помощью оригинального спектрофотометра ДСФГ.

Определение концентраций хлорофилла фитопланктона методом дифференциальной спектрофотометрии основано на регистрации разницы спектров поглощения света водой с водорослями и той же водой, из которой водоросли удалены. Первая проба помещается в измерительную (рабочую) кювету, вторая — в кювету сравнения. Удаление водорослей проводят фильтрацией или центрифугированием. Для таких определений удобен дифференциальный спектрофотометр ДСФГ, созданный на базе серийных двулучевых спектрофотометров [1].

Известно, что оптическая плотность (E) светорассеивающих взвесей дисперсных частиц определяется равенством

$$E = \lg I_0/I, \quad (1)$$

где I_0 — интенсивность входящего потока радиации, I — выходящего. При этом величина E существенно зависит от условий измерения лучистых потоков I , проходящих через исследуемый образец: от рассеивания света образцом, от приемного устройства, апертуры этого устройства, от некоторых внешних факторов. Поэтому E иногда называют инструментальной оптической плотностью — $E_{\text{инстр}}$. Очевидно, что она может принимать значения в диапазоне

$$E_n = kI \leq E_{\text{инстр}} = k_{\text{инстр}} I \leq E_{\text{осл}} - \epsilon I = (k + \sigma) I, \quad (2)$$

где $E_{\text{осл}}$, E_n и $E_{\text{инстр}}$ — оптические плотности, обусловленные ослаблением, истинным поглощением и условиями измерения лу-

© А. Д. Апонасенко, **Ф. Я. Сидько**, В. А. Васильев

чистых потоков, связанных со спектральными свойствами прибора; k , ϵ и δ — показатели поглощения, ослабления и рассеяния; $k_{\text{инстр}}$ — инструментальный показатель поглощения; l — толщина образца. Отсюда следует, что при оценке концентраций хлорофилла „а” (и других пигментов) в клетках водорослей необходимо учитывать условия, при которых записывается их спектр поглощения.

Ослабление света, распространяющегося во взвесах водорослей и регистрируемого приемным устройством спектрофотометра, можно выразить уравнением

$$-dI = \{a(\omega)k + [1 - a(\omega)]\epsilon\} I dl \quad (3)$$

или в интегральной форме

$$E_{\text{инстр}} = a(\omega)kl + [1 - a(\omega)]\epsilon l = E_n + E_p, \quad (4)$$

где $a(\omega)$ и $1 - a(\omega)$ — доли светового потока, распространяющегося в телесном угле ω и вне его, ослабляемые с показателями поглощения k и ослабления ϵ ; $E_{\text{инстр}}$, E_n , E_p — оптическая плотность и ее составляющие, обусловленные поглощением и рассеянием света соответственно. Доля $a(\omega)$ определяется прежде всего значением телесного угла ω , спектральной зависимостью показателей k , ϵ и индикатрисы рассеяния света в исследуемой среде. Для большинства взвесей биологических частиц имеет место ослабление светорассеяния с увеличением длины волны. По мере уменьшения угла ω (удаления кюветы со взвесью от входного окна приемника излучения) возрастают величины $E_{\text{инстр}}$ и E_p , а величина E_n уменьшается. При этом четко проявляется спектральная зависимость светорассеяния, особенно в области красной полосы поглощения хлорофилла в связи с аномальной дисперсией в этой области. В случае однократного рассеяния при одинаковых условиях измерения оптическую плотность $E_{\text{инстр}}$ и ее составляющие E_n и E_p можно считать пропорциональными концентрации частиц.

Для определения содержания хлорофилла используется область его длинноволнового максимума (670—750 нм), в которой поглощение света другими пигментами минимально. В области коротковолновой полосы поглощения хлорофилла его определению мешают каротиноиды и другие пигменты клеток планктона, а также растворенное в воде „желтое” вещество. Концентрации хлорофилла рассчитывают на основании выражения

$$\Delta E_{680} = E_{680} - E_{750} = k_{680} C_a l \quad (5)$$

или

$$C_a = \frac{E_{680}}{k_{680} (\text{уд}) l}, \quad (6)$$

где C_a — концентрация хлорофилла „а“, k_{680} (уд) — удельный показатель поглощения хлорофилла в клетках при $\lambda = 680$ нм, l — толщина слоя взвеси, E_{680} и E_{750} — оптические плотности взвеси в красном максимуме поглощения хлорофилла и за его пределами соответственно. Значение E_{750} , характеризующее ослабление потока излучения за счет светорассеяния, берут в качестве начала отсчета (нулевой линии) оптической плотности пигментов.

При использовании стандартных кювет длиной 1 см можно измерить концентрации хлорофилла порядка 4—5 мг/м³, т. е. характерные для суспензий культур водорослей. При работе с природными водами с меньшими концентрациями клеток водорослей используют кюветы большей длины, до 0,5 м, а также более высокую чувствительность прибора, варьирование которой предусмотрено для дифференциального спектрофотометра типа ДСФГ. В таком случае непосредственно в пробах воды можно измерить концентрацию хлорофилла порядка нескольких сотых миллиграмма в 1 м³. Например, с помощью ДСФГ, имеющего чувствительность в области 600—700 нм $5 \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности, и кюветы длиной 0,5 м, при идеальной компенсации поглощения и рассеяния света взвешенными и растворенными веществами (исключая водоросли и их пигменты), содержащимися в опытной и эталонной пробах, можно определить концентрацию хлорофилла, равную согласно формуле (6):

$$C_a = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{k_{680} (\text{уд})} = \frac{5 \cdot 10^{-5}}{65 \cdot 10^{-4} \cdot 0,5} = 0,015 \text{ мг/м}^3$$

при k_{680} (уд) = $65 \cdot 10^{-4}$ м³/мг.

Однако идеальной компенсации поглощения и рассеяния света в рабочей и эталонной кюветах добиться довольно сложно. Основной причиной являются помехи, связанные с некомпенсированностью температуры в кюветах, которая влияет на спектральные свойства воды, а также с различием средних величин оптического пути проходящих через них лучей. Кроме того, при низких, менее 1 мг/м³, концентрациях хлорофилла в области его красного максимума велико поглощение света водой, взвешенными в ней частицами и растворенными веществами, которое на один-два порядка выше, чем за счет самого пигмента.

Температурная зависимость положения полос поглощения воды приводит к изменениям ее спектральных показателей, особенно в области 680—780 нм. По нашим наблюдениям, при нагревании воды от 10 до 40 °С максимум ее спектра смещается на 12,5 нм в сторону коротких длин волн, а показатели поглощения (k) увеличиваются более чем на $0,03 \text{ м}^{-1}$. Это может привести к завышению поглощения нативного хлорофилла при его низких концентрациях на порядок и более. Поэтому очень важно выравнивать температуру воды в кюветах, пользуясь любыми термостатирующими устройствами.

Сложнее выравнивать средние оптические пути лучей, проходящих сквозь рабочую и эталонную кюветы к приемнику излучения. Частично их разность ($\Delta l = l_{\text{раб}} - l_{\text{этал}}$) удастся скомпенсировать, помещая дополнительные кюветы толщиной 1—3 мм в рабочий канал и канал сравнения.

Процедура определения хлорофилла данным методом сводится к следующему. Отобранную пробу воды наливают в трубчатый спиральный радиатор, помещают в термостат и подогревают (или охлаждают) до температуры воды в кювете сравнения, после чего заполняют рабочую кювету. В кювету сравнения (эталон) наливают дистиллированную воду или фильтрат используемой пробы, не содержащий водоросли. При работе в олиготрофных водоемах в качестве эталона можно брать воду, поднятую с глубин ниже эвфотной зоны, где практически нет водорослей. Затем записывается дифференциальный спектр поглощения на спектрофотометре ДСФГ. В зависимости от прозрачности воды используются кюветы длиной 10—50 см.

Результаты применения метода в различных внутренних водоемах и Мировом океане показали возможность достоверного определения содержания нативного хлорофилла без экстракции из клеток водорослей при концентрациях порядка $0,1 \text{ мг/м}^3$, если вода относительно чистая, с условной прозрачностью по диску Секки более 20 м. В водах с прозрачностью 5—20 м можно улавливать концентрацию пигмента от $0,5 \text{ мг/м}^3$, при прозрачности 5 м — от 1 мг/м^3 . При концентрациях пигмента, близких к нижним пределам измеряемых величин, относительные ошибки определения составляют 10—20 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апонасенко А. Д., Франк Н. А., Сидько Ф. Я. Дифференциальный спектрофотометр для гидрооптических исследований // Океанология. 1976. Т. 16, вып. 5.

Н. А. Гаевский, И. Ю. Шатров, В. М. Гольд

*Красноярский университет***ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПИГМЕНТОВ
ФИТОПЛАНКТОНА**

Рассмотрены флуоресцентные методы определения общего содержания хлорофилла „а” и его распределения по основным таксономическим группам водорослей *in vivo*, хлорофиллов „а” и „b”, их дериватов в экстракте.

Флуоресцентный анализ пигментов планктона отличается высокой чувствительностью, которая при работе с экстрактами на два порядка выше, чем у фотометрических методов [7, 8]. Это позволяет количественно определять пигменты в пробах малого объема или при очень низком содержании водорослей. Определение пигментов может осуществляться как в экстрактах, так и в интактных клетках, что дает возможность разрабатывать различные экспресс-методы, используемые при организации оперативного мониторинга, биоиндикации и биотестировании природных и сточных вод. Применение флуоресцентных методов позволяет реально подойти к автоматизации процесса оценки вклада отдельных систематических групп водорослей в общую биомассу фитопланктона [1—4].

Определение хлорофилла „а” *in vivo*. Теоретическое обоснование флуоресцентных методов определения хлорофилла и его распределения по основным таксономическим группам фитопланктона связано со способностью этого пигмента флуоресцировать под воздействием спектрально различного света, поглощаемого специфическими пигментными системами отдельных водорослей [2—4]. В общем виде связь интенсивности флуоресценции (Φ) и концентрации хлорофилла „а” (C_a) выражается формулой

$$\Phi = K C_a.$$

Коэффициент K — удельный выход флуоресценции, который определяется экспериментально. Он зависит от принадлежности водорослей к той или иной таксономической группе, характеризующейся определенными пигментами, и от спектрального состава

ва возбуждающего света (табл. 1). Поэтому, если фотолюминесценцию возбуждать светом какой-либо одной, например сине-фиолетовой, области спектра (так называемый монохроматический вариант метода), снижается уровень корреляции содержания хлорофилла „а” с интенсивностью флуоресценции, особенно при анализе проб из водоемов с высоким таксономическим разнообразием водорослей [6]. В таких случаях в качестве возбуждающего необходимо использовать излучение нескольких участков спектра, не совпадающих с областью регистрации флуоресценции (полихроматический вариант).

Таблица 1

Средние значения удельных выходов флуоресценции хлорофилла „а” у водорослей различных отделов при возбуждении синим (400 нм), сине-зеленым (510 нм) и зеленым (540 нм) светом (в числителе — выход информации на 1 мкг хлорофилла, в знаменателе — относительные единицы)

Водоросли	Удельный выход флуоресценции		
	400 нм	510 нм	540 нм
Зеленые, эвгленовые			
<i>Ankistrodesmus pseudomirabilis</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus bijugatus</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>Euglena sp.</i>	$37,2 \pm 6,24$ 1,00	$22,7 \pm 3,45$ 0,70 \pm 0,027	$3,1 \pm 0,49$ 0,10 \pm 0,006
Диатомовые			
<i>Nitzschia palea</i> , <i>N. communis</i> , <i>Asterionella formosa</i> ¹ , <i>Melosira granulata</i> var. <i>angustissima</i> ²	$11,2 \pm 0,41$ 1,00	$13,4 \pm 0,33$ 1,22 \pm 0,036	$3,2 \pm 0,09$ 0,29 \pm 0,009
Сине-зеленые			
<i>Anabaena variabilis</i> , <i>A. variabilis</i> ³ , <i>Anacystis nidulans</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ² , <i>Microcystis firma</i> , <i>Synechococcus sp.</i> , <i>S. minuscula</i>	$2,7 \pm 0,38$ 1,00	$4,0 \pm 0,41$ 1,50 \pm 0,080	$2,6 \pm 0,23$ 0,99 \pm 0,058

¹ Из эстуария ручья, впадающего в оз. Шира.

² Красноярского водохранилища в период массовой вегетации вида.

³ Из Киевского водохранилища в период цветения.

Для гетерогенной по составу водорослей пробы природного фитопланктона справедливо выражение

$$\Phi = K_{\lambda(i)} C_a(i), \quad (2)$$

где K — удельный выход флуоресценции хлорофилла „а” при возбуждении светом с длиной волны λ для водорослей i -го отдела, C_a — содержание хлорофилла „а” этих водорослей.

Тогда общая концентрация хлорофилла „а” определяется как сумма его концентраций каждой группы водорослей. Слагаемые могут быть определены путем решения системы линейных уравнений, число которых соответствует числу таксономических групп водорослей, объединенных единым набором фотосинтетических пигментов:

$$\begin{aligned}\Phi_{\lambda_1} &= K_{\lambda_1(1)} C_a(1) + K_{\lambda_1(2)} C_a(2) + \dots + K_{\lambda_1(i)} C_a(i), \\ \Phi_{\lambda_2} &= K_{\lambda_2(1)} C_a(1) + K_{\lambda_2(2)} C_a(2) + \dots + K_{\lambda_2(i)} C_a(i), \\ \Phi_{\lambda_n} &= K_{\lambda_n(1)} C_a(1) + K_{\lambda_n(2)} C_a(2) + \dots + K_{\lambda_n(i)} C_a(i),\end{aligned}\quad (3)$$

где $\Phi_{\lambda_1}, \Phi_{\lambda_2} \dots \Phi_{\lambda_n}$ — интенсивность флуоресценции при ее возбуждении светом отдельных участков спектра (1, 2 ... n), количество которых равно числу изучаемых таксономических групп, $K_{\lambda_1(1)}, K_{\lambda_1(2)} \dots K_{\lambda_1(i)}$ — удельный выход флуоресценции хлорофилла для конкретной группы водорослей (обозначенной 1, 2 ... i) при возбуждении светом определенного участка спектра, $K_{\lambda_2(1)}, K_{\lambda_2(2)} \dots K_{\lambda_2(i)}, K_{\lambda_n(1)}, K_{\lambda_n(2)} \dots K_{\lambda_n(i)}$ — то же при возбуждении светом остальных спектральных участков.

Диапазон длин волн возбуждающего света выбирается исходя из специфических отличий спектров действия флуоресценции у представителей отдельных таксономических групп водорослей [12].

Численные значения коэффициентов $K_{\lambda(i)}$ системы линейных уравнений (3) получены в лабораторных условиях на альгологически чистых культурах планктонных водорослей трех основных отделов (*Cyanophyta*, *Bacillariophyta*, *Chlorophyta*), а также в естественных условиях в период массового развития отдельных видов в водоемах различных регионов страны. Для возбуждения флуоресценции было выбрано излучение трех областей спектра: синее, $\lambda_{\text{макс}} = 400$ нм, поглощаемое преимущественно хлорофилл-белковым комплексом зеленых и эвгленовых водорослей (хлорофиллы „а”, „b”), сине-зеленое, $\lambda_{\text{макс}} = 515$ нм — для фукоксантина и хлорофилл-белкового комплекса диатомовых водорослей (хлорофиллы „а”, „с”), зеленое, $\lambda_{\text{макс}} = 540$ нм — для фикобилинового комплекса сине-зеленых водорослей. При расчетах значений $K_{\lambda(i)}$ используется „чистый” сигнал флуоресценции, определяемой как разность между ее интенсивностью в пробах фито-планктона и фильтрата, не содержащего клетки водорослей.

Результаты показали, что различия удельных выходов флуоресценции в пределах вида и рода значительно меньше, чем меж-

ду отделами водорослей (см. табл. 1). Такая высокая генетическая детерминация удельных выходов флуоресценции обеспечивает стабильность коэффициентов $K_{\lambda(i)}$, необходимых для расчетов, и позволяет избежать частой и довольно сложной процедуры получения калибровочных данных.

Детали флуориметрических измерений, а также конструкции флуориметров описаны в специальных работах [2, 3].

Экспериментальная проверка полихроматического варианта флуоресцентного анализа пигментов проведена на искусственных и природных сообществах водорослей. При работе с искусственными смесями в качестве коэффициентов $K_{\lambda(i)}$ в расчетах взяты удельные выходы флуоресценции отдельных водорослей, в натуральных экспериментах — средние для каждой таксономической группы значения. При необходимости вводилась коррекция этих коэффициентов, учитывающая специфику видового состава фитопланктона конкретного водоема. По материалам натуральных наблюдений методом регрессии проведен анализ данных по хлорофиллу „а”, полученных стандартным спектрофотометрическим определением [11] и по флуоресценции. В расчетах данных флуориметрических измерений использовалась система следующих уравнений, составленных на основании табл. 1:

$$\Phi_{400} = 2,9 C_{a(cз)} + 11,3 C_{a(л)} + 49,4 C_{a(з)},$$

$$\Phi_{515} = 4,5 C_{a(cз)} + 13,9 C_{a(л)} + 31,4 C_{a(з)}, \quad (4)$$

$$\Phi_{540} = 3,0 C_{a(cз)} + 3,3 C_{a(л)} + 4,3 C_{a(з)},$$

где $C_{a(cз)}$, $C_{a(л)}$, $C_{a(з)}$ — содержание хлорофилла „а”, приходящееся на долю сине-зеленых, диатомовых и зеленых водорослей соответственно, Φ_{400} , Φ_{515} , Φ_{540} — интенсивность флуоресценции при возбуждении светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 400, 515 и 540 нм. После решения относительно C_a уравнения приобретают вид:

$$C_{a(c-з)} = 0,069 \Phi_{400} - 0,183 \Phi_{515} + 0,541 \Phi_{540},$$

$$C_{a(л)} = 0,121 \Phi_{400} + 0,217 \Phi_{515} - 0,210 \Phi_{540}, \quad (5)$$

$$C_{a(з)} = 0,044 \Phi_{400} - 0,039 \Phi_{515} + 0,016 \Phi_{540}.$$

Анализ показал наличие тесной связи между результатами спектрофотометрических и флуориметрических измерений, коэффициенты регрессии этой связи оказались близкими к единице. Причем в случае полихроматического варианта метода прослежи-

вается более высокая степень корреляции по сравнению с монохроматическим, особенно если последний основан на возбуждении флуоресценции синим светом. При использовании зеленого света в качестве возбуждающего коэффициенты корреляции достоверно не отличимы от полученных для данных полихроматического варианта (табл. 2). Это, а также небольшие таксономические различия удельных выходов флуоресценции, возбуждаемой зеленым светом, указывает на его предпочтительность в случае монохроматического варианта метода.

Таблица 2

Коэффициенты линейной регрессии (b) и корреляции (r) при анализе общего содержания хлорофилла с использованием разных вариантов флуоресцентного (x) и стандартного спектрофотометрического (y) методов

Анализируемый материал	Число проб	Метод			
		полихроматический при $\lambda = 400, 515, 540$ нм		монохроматический при $\lambda = 400$ или 540 нм	
		b	r_1	r_{400}	r_{540}
Смесь культур водорослей	12	$1,01 \pm 0,08$	0,97	0,64	0,93
Фитопланктон Красноярского водохранилища					
август 1982 г.	104	$0,98 \pm 0,004$	0,99	0,98	0,99
август 1983 г.	73	$1,44 \pm 0,41$	0,64	0,55	0,67
август 1984 г.	113	0,75	0,87	0,56	0,87
Фитопланктон киевского водохранилища					
август 1985 г.	32	$1,16 \pm 0,18$	0,76	0,44	0,69
Фитопланктон Рыбинского водохранилища					
август 1986 г.	34	$0,98 \pm 0,08$	0,90	0,57	0,89
май, июнь 1987 г.	52	$1,14 \pm 0,05$	0,78	0,66	0,78

Примечание. Данные спектрофотометрического метода [10, 11] для Киевского водохранилища получены Л. А. Сиренко, для Рыбинского — И. Л. Пыриной и Н. М. Минеевой.

Благодаря возможности количественного анализа содержания хлорофилла „а” в отдельных группах водорослей полихроматическая модификация метода позволяет подойти к оценке таксономической структуры фитопланктона [1, 4]. Специально проведенные эксперименты [4] со смешанными культурами подтверждают наличие тесной корреляции между содержанием хлорофилла „а”, измеренным флуорометрически для отдельных групп водорослей и ожидаемым при составлении смеси по концентрациям пигмента в суспензиях отдельных видов. Коэффициент линейной регрессии этой связи (b) для *Chlorella vulgaris* равен $0,9 \pm 0,21$ при коэф-

фициенте корреляции $r = 0,78$, для *Nitzschia palea* $b = 0,9 \pm 0,10$ при $r = 0,96$, для *Anabaena variabilis* $b = 1,1 \pm 0,11$ при $r = 0,98$.

Для природного фитопланктона нет прямых способов дифференцированного определения хлорофилла „а” у водорослей отдельных таксономических групп. В этом случае объективность метода может быть оценена сопоставлением концентраций пигмента, рассчитанных для водорослей различных отделов, с их биомассой. В полевых экспериментах такого рода получены достаточно высокие уровни корреляции между содержанием хлорофилла, дифференцированным по отделам водорослей, и их биомассой при доминировании небольшого числа видов из диатомовых или сине-зеленых (табл. 3). Достоверная корреляционная связь ($P = 0,95$) зарегистрирована и для сопутствующих групп водорослей, если их доля в общей биомассе ощутима. При использовании в экспериментах той же серии (1982, 1983, 1986 гг., табл. 3) хлорофиллов „b”, „с”, измеренных спектрофотометрически, в качестве маркеров зеленых и диатомовых водорослей соответственно

Таблица 3

Оценка корреляции между хлорофиллом „а”, приходящимся на долю водорослей определенного отдела, и их наличной биомассой

Место и время отбора проб	Число проб	Средняя биомасса водорослей, доля от общей		Коэффициент корреляции		
		сине-зеленые	диатомовые	для сине-зеленых	для диатомовых	для общего фитопланктона
Красноярское водохранилище						
август 1982 г.	106	0,97	0,03	0,76	0,14	0,76
август 1983 г.	91	0,76	0,23	0,61	0,32	0,64
август 1984 г.	120	0,88	0,11	0,80	0,27	0,81
Киевское, Каневское водохранилища						
август 1985 г.	28	0,54	0,37	0,61	0,59	0,69
Саяно-Шушенское водохранилище						
июль 1986 г.	74	0,02	0,85	0,00	0,56	0,59
Рыбинское водохранилище						
август 1986 г.	26	0,83	0,12	0,95	0,58	0,94

Примечание. Данные по биомассе фитопланктона Киевского и Каневского водохранилищ получены А. А. Сиренко. Рыбинского — Л. Г. Корневой.

достоверная корреляция между количеством пигмента и биомассой содержащих его клеток не получена.

Основной источник погрешностей флуоресцентного метода связан с определением удельного выхода флуоресценции $K_{\lambda}(\eta)$. При полихроматическом варианте необходимые для системы линейных уравнений (3) значения этого коэффициента определяются на альгологически чистых культурах водорослей различных отделов. Очевидно, что точность измерения концентраций хлорофилла „а” в водоеме, дифференцированных по отделам водорослей, будет тем меньше, чем больше видов используется при определении величины K и чем ближе их набор к видовому составу фитопланктона. В отдельных случаях удельные выходы флуоресценции удастся откорректировать по природным пробам в период массового развития водорослей определенной таксономической группы, например при весеннем цветении воды диатомовыми или летнем — сине-зелеными. Возможна также коррекция коэффициентов для уравнений (3) на пробах фитопланктона с известным соотношением отдельных групп водорослей [2].

Определение хлорофиллов „а” и „b” и их дериватов в экстракте. По аналогии со спектрофотометрическим методом [5] использование флуоресцентного анализа для дифференциальной оценки содержания хлорофиллов „а” и „b” в общем экстракте основано на различии спектров возбуждения флуоресценции этих пигментов [9], а их дериватов — на эффекте смешивания максимума флуоресценции с одновременным ослаблением интенсивности свечения после подкисления.

Практическое определение сводится к следующему. Экспериментальным путем подбираются светофильтры, спектральные свойства которых обеспечивают преимущественное возбуждение хлорофиллов „а” и „b” и позволяют получить высокие значения удельного выхода флуоресценции и кислотного фактора (отношение флуоресценции нейтральных и подкисленных экстрактов). Для этого могут использоваться стеклянные фильтры: ЖЗС-12 + СС-15, $\lambda_{\text{макс}} = 440 \pm 10$ нм и ЖС-11 + + ФС-6, $\lambda_{\text{макс}} = 470 \pm 10$ нм. Регистрация флуоресценции производится в области $\lambda > 650$ нм со светофильтрами КС-18 + ПС-8.

Связь концентраций хлорофиллов „а” и „b” с выходом флуоресценции при ее возбуждении светом двух указанных участков спектра выражается системой линейных уравнений:

$$C_a = A_1 \Phi_a(440), C_a = A_2 \Phi_a(470), \quad (6)$$

$$C_b = A_3 \Phi_b(440), C_b = A_4 \Phi_b(470),$$

где C_a , C_b — концентрация хлорофиллов „а” и „b”, A_1 , A_2 — величины, обратные выходу флуоресценции хлорофилла „а” при

возбуждении светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 440 и 470 нм соответственно, A_3 , A_4 — то же для хлорофилла „b”, $\Phi_{a(440)}$, $\Phi_{a(470)}$ — флуоресценция хлорофилла „a” при возбуждении светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 440 и 470 нм соответственно, $\Phi_{b(440)}$, $\Phi_{b(470)}$ — то же для хлорофилла „b”.

Удельный выход флуоресценции (K_λ) получают для используемой в работе аппаратуры на хроматографически чистых препаратах хлорофиллов „a” и „b” в 90 %-ном ацетоне при возбуждении излучением с максимумом в области 440 и 470 нм. В случае неоднократных измерений величину K_λ находят с помощью метода регрессии. Одновременно оценивают кислотный фактор. В качестве примера ниже приведены результаты определения средних значений этих характеристик для конкретного флуориметра:

	$\lambda_{\text{макс}}$ возбуждающего света, нм	K_λ	Кислотный фактор
Хлорофилл „a”	440	2,660	2,98
	470	0,660	2,58
Хлорофилл „b”	440	0,742	1,88
	470	0,890	0,83

На основании этих величин составляется система линейных уравнений, решение которых позволяет определить концентрацию хлорофиллов „a”, „b” и их феопроизводных в смешанном ацетоновом экстракте:

$$\Phi(440) = \frac{C_a}{2,66} + \frac{C_{\Phi(a)}}{2,66 \cdot 2,98} + \frac{C_a}{0,74} + \frac{C_{\Phi(b)}}{0,74 \cdot 1,88},$$

$$\Phi(470) = \frac{C_a}{2,66} + \frac{C_{\Phi(a)}}{2,66 \cdot 2,58} + \frac{C_b}{0,89} + \frac{C_{\Phi(b)}}{0,89 \cdot 2,58},$$

$$\Phi(440, \text{HCl}) = \frac{C_a}{2,66 \cdot 2,98} + \frac{C_{\Phi(a)}}{2,66 \cdot 2,98} + \frac{C_b}{0,74 \cdot 1,88} + \frac{C_{\Phi(b)}}{0,74 \cdot 1,88},$$

$$\Phi(470, \text{HCl}) = \frac{C_a}{0,66 \cdot 2,58} + \frac{C_{\Phi(a)}}{0,66 \cdot 2,58} + \frac{C_b}{0,89 \cdot 0,83} + \frac{C_{\Phi(b)}}{0,89 \cdot 0,83}.$$

Подбором спектральной чувствительности флуориметра можно исключить влияние флуоресценции хлорофилла „c” (максимум испускания 625—630 нм) в пробах, содержащих диатомовые во-

доросли. В практике работ с такого рода аппаратурой достигалась интенсивность свечения эквимольного раствора хлорофилла „с” в области максимума флуоресценции хлорофилла „а”, составлявшая не более 10 % флуоресценции основного пигмента [9].

Апробация флуоресцентного определения хлорофилла „а”, проведенная сравнением результатов с полученными спектрофотометрически [10] на пробах из Рыбинского водохранилища (1986—1987 гг.), показала наличие статистически достоверной связи между теми и другими данными: коэффициент линейной регрессии составил 0,92 при коэффициенте корреляции 0,97.

Таким образом, рассмотренные варианты флуоресцентного метода дают достаточно надежную информацию об уровне содержания хлорофилла в природных водах с оценкой его феопродуктивных, а также доли у водорослей доминирующих таксономических групп и вместе с тем обеспечивают оперативное ее получение. При массовых определениях пигментов фитопланктона этот метод представляется незаменимым.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаевский Н. А., Шатров И. Ю., Гольд В. М., Попельницкий В. А. Изучение флуоресцентных характеристик у некоторых представителей *Chlorophyta*, *Bacillariophyta* и *Cyanophyta* // Экологические исследования водоемов Красноярского края. Красноярск, 1983.
2. Гольд В. М., Гаевский Н. А., Белоног Н. П. и др. Методические рекомендации по дистанционным методам контроля качества поверхностных вод суши. Л., 1989. Вып. 3.
3. Гольд В. М., Гаевский Н. А., Григорьев Ю. С., Попельницкий В. А., Гехман А. В. Теоретические основы и методы изучения флуоресценции хлорофилла. Красноярск, 1984.
4. Гольд В. М., Гаевский Н. А., Шатров И. Ю., Попельницкий В. А., Рубцов С. А. Опыт использования флуоресценции для дифференциальной оценки содержания хлорофилла „а” у планктонных водорослей // Гидробиол. журн. 1986. Т. 22, № 3.
5. Евстигнеев В. Б., Прохорова Л. И. Об определении хлорофилла „а” и „b” в смеси без разделения компонентов // Биохимия. 1968. Т. 33, вып. 2.
6. Карабашев Г. С. Контактный метод активного (люминесцентного) зондирования // Современные методы количественной оценки распределения морского планктона. М., 1983.
7. Кобленц-Мишке О. И. Экстрактный и безэкстрактный метод определения фотосинтетических пигментов в пробе // Современные методы количественной оценки распределения морского планктона. М., 1983.
8. Фотосинтез и биопродуктивность: методы определения. М., 1989.
9. Loftus M. E., Carpenter J. H. A fluorometric method for determining chlorophyll *a*, *b*, and *c* // J. Mar. Res. 1971. Vol. 29, N 2.
10. Lorenzen C. J., Jeffrey S. W. Determination of chlorophyll in sea-water // UNESCO technical papers in marine sciences. Paris, 1980. N 35.
11. UNESCO. Determination of photosynthetic pigments // Monographs on oceanographic methodology. Paris, 1966. N 1.
12. Yentsch C. S., Phynney D. A. Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton population // J. Plankt. Res. 1985. Vol. 7, N 5.

А. А. Гительсон

Гидрохимический институт

ДИСТАНЦИОННОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ ХЛОРОФИЛЛА „А“ ПО СПЕКТРАМ ДИФфуЗНОГО РАССЕЯННОГО ВОДОЙ ИЗЛУЧЕНИЯ

Описывается определение хлорофилла в водоемах методом пассивного дистанционного зондирования по спектрам восходящего от воды диффузного рассеянного излучения.

Существенная временная и пространственная изменчивость гидрологических и гидрохимических показателей требует создания методов измерений, адекватно отражающих процессы, происходящие в водных объектах. Аэрокосмические методы, не имеющие альтернатив временного и пространственного разрешения, позволяют оперативно оценивать качество природных вод одновременно на больших акваториях. Одним из наиболее перспективных и простых методов дистанционного определения концентраций оптически активных ингредиентов — хлорофилла „а“, минеральных взвешенных и растворенных органических веществ — является метод регистрации и дешифрирования спектров восходящего от воды диффузного рассеянного излучения.

В основу метода положена зависимость между яркостью восходящего от воды солнечного излучения и концентрациями оптически активных ингредиентов. Коэффициент спектральной яркости (КСЯ) $\rho(\lambda)$ определяется значениями яркости света ($B(\lambda)$) и облученностью ($E \downarrow(\lambda)$) непосредственно под поверхностью воды [6, 10]:

$$\rho(\lambda) = B(\lambda) / E \downarrow(\lambda). \quad (1)$$

С другой стороны, $\rho(\lambda)$ зависит от первичных гидрооптических характеристик воды: показателей поглощения $\kappa(\lambda)$, рассеяния под углом 180° — $\sigma_\lambda(180^\circ)$ и рассеяния назад $\beta(\lambda)$:

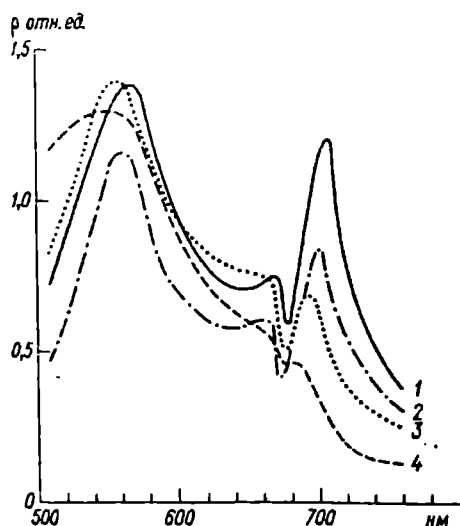
$$\rho(\lambda) = \frac{\sigma_{\lambda}(180^{\circ})}{2 [\kappa(\lambda) + \beta(\lambda)]} \quad (2)$$

Показатели рассеяния определяются в основном рассеянием света на частицах с малыми размерами (меньше 1 мкм), относящихся преимущественно к минеральной взвеси, а показатель поглощения $\kappa(\lambda)$ — поглощением света более крупными „мягкими“ частицами, в частности фитопланктоном.

Такая опосредованная связь параметра $\rho(\lambda)$ с концентрациями этих ингредиентов делает возможным их дистанционное измерение.

Типичные спектры коэффициентов спектральной яркости ρ природных вод при различных значениях $C_{\text{хл}}$.

1 — 98 мг/м³, 2 — 82 мг/м³,
3 — 23 мг/м³, 4 — 5,3 мг/м³.



Типичные спектральные зависимости $\rho(\lambda)$ приведены на рисунке. Наибольшие его значения наблюдаются в области волн 540—580 нм. Они связаны главным образом с рассеянием света на минеральных взвешенных частицах. При больших концентрациях хлорофилла фитопланктона ($C_{\text{хл}} > 30$ мг/м³) в области волн 630—635 нм наблюдается минимум, а на волнах 650—655 нм — максимум. При всех концентрациях хлорофилла $\rho(\lambda)$ минимален на волне 675 нм. Положение максимума ($\lambda_{\text{макс}}$) изменяется от 685 нм при малых значениях $C_{\text{хл}}$ до 700 нм и далее при

$C_{\text{хл}} > 30 \text{ мг/м}^3$ [1, 4, 5]. Указанные локальные экстремумы связаны со спектральным ходом поглощения света пигментами фитопланктона и водой [1, 4]. При изменении $C_{\text{хл}}$ от 1 до 100 мг/м^3 отношение $\rho(\lambda)_{\text{макс}}/\rho(560)$ возрастает более чем на порядок. При этом оказывается, что связь величин $C_{\text{хл}}$ и $\lambda_{\text{макс}}$ весьма тесная [4]. Например, для оз. Балатон $\lambda_{\text{макс}} = 650 \text{ нм}$ $C_{\text{хл}}^{0,019}$ при коэффициенте корреляции более 0,93. По величине $\lambda_{\text{макс}}$ возможны дистанционные оценки $C_{\text{хл}}$ с ошибкой менее 6 мг/м^3 .

Установленные нами индексы цвета (отношения коэффициентов спектральных яркостей на двух волнах) с хорошей точностью определяют концентрацию хлорофилла „а” фитопланктона [5, 7]. Так, уравнение вида

$$C_{\text{хл}} = \alpha [\rho(700)/\rho(675)]^\beta \quad (3)$$

тесно связывает величину $C_{\text{хл}}$ (мг/м^3) с дистанционно определяемым показателем $\rho(700)/\rho(675)$ при коэффициенте корреляции больше 0,95 и позволяет проводить оценки концентраций пигмента со стандартной ошибкой менее $2,5 \text{ мг/м}^3$ [3].

Изложенные принципы положены в основу методов экспрессного дистанционного определения концентрации хлорофилла „а” фитопланктона с борта судна, вертолета или самолета.

Для дистанционных измерений применяют два типа спектрометров [2, 3]. В одном из них измеряют спектры яркости восходящего от воды излучения и облученности сверху при последовательной перестройке монохроматора от 440 до 750 нм. Данные измерений по частотным меткам оцифровывают и регистрируют в автоматическом приборе регистрации данных типа АПРД-3. В реальном масштабе времени в приборе АПРД-3 определяют длину волны, на которой наблюдают максимум КСЯ, и по ее значению ($\lambda_{\text{макс}}$) проводят оценку величины $C_{\text{хл}}$ (мг/м^3), используя соотношение вида

$$C_{\text{хл}} = a \lambda_{\text{макс}}^b \quad (4)$$

Если определяется отношение $\rho(\lambda_i)/\rho(\lambda_j)$, то концентрацию хлорофилла вычисляют по формуле (3). При рутинных измерениях используют двухканальный портативный спектрометр. Излучение воды через устройство, определяющее его входную апертуру, и через интерференционные фильтры, „вырезающие” сигнал на информативных длинах волн, подается на фотопри-

емники — кремниевые pin-фотодиоды. С выходов фотоприемников сигналы поступают на усилители, а с них — на делитель. На выходе делителя формируется сигнал, пропорциональный отношению $\rho(\lambda_i)/\rho(\lambda_j)$. Он регистрируется на ленте самописца и цифровом вольтметре.

Для оценки точности метода многократно были проведены сравнения результатов дистанционных и контактных измерений [8, 9] в пробах воды, отобранных синхронно с борта вертолета. Ошибка оценки концентрации пигмента в диапазоне 3—100 мг/м³ не превышала 3 мг/м³, а в диапазоне до 400 мг/м³ была не более 13 мг/м³ [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гительсон А. А. Спектральные особенности коэффициентов яркости мезотрофных и эвтрофных объектов // Использование спутниковой информации в исследовании океана и атмосферы. М., 1989.

2. Гительсон А. А., Гарбузов Г. П. Методы дистанционной оценки концентраций оптически активных ингредиентов в природных водах // Технические средства и методы освоения океанов и морей: Тез. докл. Всес. школы. М., 1989. Т. 2.

3. Гительсон А. А., Дубовицкий Г. А., Кейдан Г. П., Лопатченко Л. Л. Оценки качества водных экосистем по их излучению в видимой области спектра // Экологическое нормирование и моделирование антропогенного воздействия на водные экосистемы. Л., 1988.

4. Гительсон А. А., Кондратьев К. Я. О механизме образования и возможности использования для дистанционного зондирования максимума вблизи 700 нм в спектрах излучения водных объектов // ДАН СССР. 1989. Т. 306, № 1.

5. Гительсон А. А., Силади Ф. Радиационные модели мезотрофных и эвтрофных водных объектов // Исследование Земли из космоса. 1988. № 6.

6. Голубицкий Б. М., Левин И. М., Танташев М. В. Коэффициент яркости полубесконечного слоя морской воды // Изв. АН СССР. Физика атмосферы и океана. 1974. Т. 11, № 10.

7. Кондратьев К. Я., Гительсон А. А., Кейдан Г. П. Метод дистанционного определения гидрохимических и гидробиологических показателей водных объектов // ДАН СССР. 1987. Т. 295, № 2.

8. Методические рекомендации по дистанционным методам контроля качества поверхностных вод суши. Вып. 3. Экспрессное флуориметрическое определение концентраций хлорофилла „а” и фотосинтетической активности фитопланктона. Л., 1989.

9. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Л., 1983.

10. Gordon H. R. Simple calculation of the diffusive reflectance of the ocean // Appl. Opt. 1973. Vol. 12, N 12.

Д. В. Поздняков

Институт озерадения РАН

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ФИТОПЛАНКТОНА ПО ДАННЫМ ДИСТАНЦИОННОГО ЛАЗЕРНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

Обсуждаются принцип метода активного оптического зондирования и возможности его использования для дистанционного определения хлорофилла в водоемах разного типа. Приведены алгоритмы расчета концентраций хлорофилла.

Сущность метода оптического активного зондирования (МО-АЗ) сводится к регистрации и амплитудно-спектральному анализу сигнала отклика водной среды в ответ на облучение монохроматическим лазерным пучком, источник которого находится над водоемом.

Водная среда, если она содержит флуорофоры, откликается на лазерное излучение определенного диапазона длин волн эмиссией вынужденного флуоресцентного свечения. В свою очередь проходящие через нее фотоны когерентного лазерного излучения испытывают поглощение и рассеивание, которое обусловлено упругим и неупругим рассеянием на молекулах воды и растворенных в ней веществ (соответственно, релеевское и комбинационное рассеяние), а также упругим рассеянием на гидрозоле (рассеяние Ми).

Показано [3], что уравнение лазерного зондирования имеет вид

$$n_f = (P_F H^2 P_L^{-1}) (4 \pi \Delta F / T \eta_{tr} \eta_{rec}) \left\{ \frac{\mu_w^2 \exp [H (\beta_L + \beta_F)]}{(1 - R_w)^2} \right\} \times \\ \times [(k_L + k_F) / \sigma_f], \quad (1)$$

где n_f — концентрация флуорофора (мг/м³), P_F — пиковое значение мощности (Вт) регистрируемого сигнала флуоресцентной эмиссии на длине волны F , соответствующей максимуму флуо-

ресценции, P_L — пиковое значение выходной мощности (Вт) монохроматического лазерного излучения с длиной волны L , H — высота расположения лазера над водной поверхностью (м), T — эффективная площадь телескопа лидарного комплекса (м^2), Δ_F — отношение ширины полосы флуоресцентной эмиссии к эффективной ширине полосы фильтра, η_{ir} — эффективность излучателя, т. е. лазера, η_{rec} — эффективность приемной системы лидара, R_w — коэффициент зеркального отражения в видимой области спектра на поверхности раздела вода—воздух при нормальном падении лазерного луча, μ_w — коэффициент преломления воды в видимой области спектра, β_L , β_F — коэффициенты ослабления соответственно лазерного и флуоресцентного излучения в атмосфере на длинах волн L и F нм (м^{-1}), k_L , k_F — эффективные коэффициенты ослабления в воде излучений с длинами волн соответственно L и F нм (м^{-1}), σ_f — эффективное сечение флуоресценции флуорофора ($\text{м}^2/\text{мг}$).

При выводе уравнения (1) делается целый ряд упрощающих предположений.

1. Фоновые засветки, обусловленные отражением от поверхности воды рассеянной и прямой солнечной радиации, уже вычтены из полезного сигнала.

2. Объем воды, в котором возбуждается флуоресценция (или комбинационное рассеяние), полностью попадает в поле зрения приемного телескопа лидара.

3. Флуоресцентный сигнал P_F является суммой приращений эмиссии флуорофора, распределенного по вертикали неограниченного по глубине водоема. Это означает, что глубина зондируемого лидаром слоя должна быть не менее чем на порядок выше максимальной из характеристических оптических длин ослабления, определяемых величиной k_F^{-1} или k_L^{-1} .

4. Из п. 3 с необходимостью следует, что в точке зондирования величины n_f ($\text{мг}/\text{м}^3$), k_L , k_F и σ_f не изменяются по глубине. На первый взгляд, это ограничение представляется достаточно серьезным, однако, по данным полевых исследований [5], коэффициент ослабления коллимированных лучей α остается примерно инвариантным по крайней мере до глубины $2\alpha^{-1}$. Если принять, что эффективные оптические длины ослабления излучения для волн F и L — величины одного порядка и определяются соответственно через k_F^{-1} и k_L^{-1} , то становится очевидным, что $(1 - 1/e^2)$ или 86,5 % флуоресцентного сигнала, воспринима-

емого лидарным телескопом, приходит с первой, а 98,2 % — с первых двух эффективных оптических длин ослабления, т. е. $(1 - 1/e^4)$.

5. Длительность высвечивания флуоресценции τ_f значительно меньше длительности лазерного импульса τ_l : $\tau_f \ll \tau_l$.

6. Атмосферные условия считаются благоприятными, и при высоте полета (H , м) авианосителя с лидаром в несколько десятков метров член $\exp(-H(\beta_L + \beta_F))$ в видимой области спектра остается инвариантным и по величине близким к единице.

7. Сечение флуоресценции флуорофора σ_f считается неизменным по зондируемой акватории (или ее части), т. е. фитоценоз в приповерхностном слое водоема должен быть однородным по составу.

8. Эффективные коэффициенты ослабления k_L и k_F должны оставаться неизменными в приповерхностном слое зондируемой акватории, и их величины не должны зависеть от концентрации флуорофора.

Реальное использование уравнения (1) в практике восстановления n_f и сопоставление результатов, полученных разными исследователями, затруднено, поскольку требуется знать абсолютные величины трудноконтролируемых и изменчивых параметров как самой лидарной системы, так и условий переноса видимого излучения в атмосфере и водной среде. Ситуация упрощается, если наряду с P_F регистрировать сигнал комбинационного рассеяния воды P_R .

На основе уравнений (1) можно получить соотношения, определяющие функциональную зависимость регистрируемых сигналов P_F и P_R от параметров лидарной системы и свойств сред, через которые происходит перенос электромагнитного излучения:

$$P_R = (P_L/H^2) (n_w \sigma_w d_r / k_R + k_L), \quad (2)$$

$$P_F = (P_L/H^2) (n_f \sigma_f d_f / k_F + k_L), \quad (3)$$

где n_w — концентрация молекул воды в единице объема, σ_w — сечение комбинационного рассеяния воды (КР),

$$d_r = (T \eta_{tr} \eta_{rec} / 4 \pi \Delta_R) \{ (1 - R_w)^2 / \mu_w^2 \exp [H(\beta_L + \beta_i)] \} \quad (4)$$

(индекс i означает соответственно F или R ; Δ_R — отношение ширины полосы КР к эффективной ширине полосы пропускания фильтра, β_R — эффективный коэффициент ослабления излучения

КР в слое атмосферы между телескопом лидара и водной поверхностью).

Величина σ_w , слабо зависящая от температуры и солености, обнаруживает спектральный ход, пропорциональный длине волны лазерного излучения в степени 4. В диапазоне температур 5—25 °С в пресных водах величину σ_w , подобно η_w , можно считать постоянной.

В условиях чистой атмосферы при $H = 100 \div 200$ м экспоненциальные члены $\exp [H(\beta_L + \beta_i)]$ могут с высокой точностью считаться постоянными и по величине близкими к 1. Следовательно, можно говорить об инвариантности и членов d_i в целом.

Делением (3) на (2) можно получить:

$$(P_F/P_R) = (n_f d_f \sigma_f / n_w \sigma_w d_r) (k_L + k_R/k_L + k_F) \quad (5)$$

$$\text{или } (P_F/P_R) = n_f \delta (k_i + k_R/k_L + k_F), \quad (6)$$

где $\delta = d_f \sigma_f / d_r n_w \sigma_w = \text{const}$ (в соответствии со сказанным выше).

Отсюда видно, что при постоянстве δ и отношения $(k_L + k_R/k_L + k_F)$ уравнение (6) может быть положено в основу восстановления величины по дистанционно измеряемым сигналам P_F и P_R . В обеспечении постоянства величины δ наибольшую сложность представляет требование о постоянном значении δ_f : необходимо, чтобы видовой состав фитопланктона по трассе полета оставался в существенной мере однородным. Постоянство отношения $(k_i + k_R/k_L + k_F)$ в реальных условиях может быть с той или иной точностью достигнуто обеспечением неизменного спектрального распределения k_λ на данном участке акватории.

Таким образом, в случае выполнения этих требований, можно записать:

$$n_f = (P_F/P_R) \delta^{-1} (k_L + k_F/k_L + k_R) = S (P_F/P_R). \quad (7)$$

Тогда для восстановления n_f по значениям (P_F/P_R) необходимо определить пересчетный коэффициент S . Этот коэффициент, как следует из сказанного выше, практически не должен зависеть от электронно-оптических свойств лидарного комплекса, высоты полета авианосителя, оптических свойств атмосферного слоя, отделяющего лидар от водоема, оптических свойств поверхности воды и зондируемой водной среды. Важно также, что для реализации лазерного зондирования не требуется освещение водоема

солнцем, ночное время даже предпочтительно, т. е. метод не должен быть чувствителен к состоянию и характеру облачности. В этой связи становятся очевидными преимущества МОАЗ по сравнению с другими дистанционными методами определения содержания хлорофилла фитопланктона.

Исследования, осуществленные рядом научных коллективов на разнообразных водных объектах (океаны, морские заливы, озера, водохранилища) с применением МОАЗ [1, 2, 4], показали, что для определенных пределов содержания хлорофилла прослеживается линейная регрессионная связь между (P_F/P_R) и $C_{хл}$. На основании этого составляют алгоритмы восстановления $C_{хл}$ по данным лидарных зондирований: $C_{хл} = f(P_F/P_R)$. Некоторые алгоритмы, полученные нами для ряда озер и водохранилищ стран СНГ, а также заимствованные из литературы, приведены в таблице. Графическое представление этих зависимостей показывает увеличение угла наклона линий регрессии от чистых и прозрачных океанических вод к морским, озерным, речным и водохранилищным.

Регрессионные соотношения, связывающие $C_{хл}$ и P_F/P_R
для водоемов различного типа

Водоем	Алгоритм	Коэффициент корреляции	Число наблюдений	Источник
Чесапикский залив, Атлантический океан	$C_{хл} = 1,068 P_F/P_R$	0,87	13	[4]
Балтийское море	$C_{хл} = -0,38 + 2,114 P_F/P_R$	0,69	18	Наши данные
Ладожское озеро	$C_{хл} = -0,48 + 4,015 P_F/P_R$	0,67	42	То же
Онежское озеро	$C_{хл} = -0,6 + 3,33 P_F/P_R$	0,62	47	То же
Рыбинское водохранилище	$C_{хл} = -0,62 + 5,375 P_F/P_R$	0,85	32	То же
Онежское озеро	$C_{хл} = -0,38 + 2,56 P_F/P_R$	0,79	50	То же
Оз. Севан	$C_{хл} = -0,68 + 3,48 P_F/P_R$	0,65	20	То же
Куйбышевское водохранилище	$C_{хл} = -2,4 + 10 P_F/P_R$	0,66	16	То же
Реки Снейк и Колумбия	$C_{хл} = 4 + 2,1 P_F/P_R$	0,87	12	[2]

Результаты использования МОАЗ для дистанционного определения хлорофилла восстановлением его концентраций на основании соответствующих алгоритмических выражений (см. таблицу) обнаруживают сильную изменчивость полей хлорофилла по акватории водоема и во времени, причем последняя в зависимости от синоптической ситуации может иметь масштабы меньше суток. Контактными измерениями трудно выявить подобные изменения

в распределении фитопланктона и соответственно дать адекватную оценку уровня его продуктивности.

Таким образом, МОАЗ перспективен для характеристики трофического состояния внутренних водоемов. Необходимо дальнейшее совершенствование этого метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондратьев К. Я., Поздняков Д. В. Оптические свойства природных вод и дистанционное зондирование фитопланктона. Л., 1988.
2. Bristow M., Bundy D., Edmonds C. Airborne laser fluorosensor survey of the Columbia & Snake rivers: simultaneous measurements of chlorophyll, dissolved organics // Int. J. Remote Sensing. 1985. Vol. 6.
3. Bristow M., Nielsen D., Bundy D., Furtex R. Use of water Raman emission to correct airborne laser fluorosensor data for effects of water optical attenuation // Appl. Opt. 1981. Vol. 20, N 17.
4. Exton R. J., Houghton W. M., Essais W. e. a. Laboratory analysis of techniques for remote sensing of estuarine parameters using laser excitation // Appl. Opt. 1983. Vol. 22, N 1.
5. Kim H. H. Interdependence of optical attenuation coefficients in oceanic waters // Appl. Opt. 1977. Vol. 16, N 1.

Л. Е. Сигарева

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН*

ПИГМЕНТНАЯ МОДЕЛЬ ФИТОПЛАНКТОНА И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Рассмотрена простая модель, описывающая зависимость между индексами E_{450}/E_{480} и E_{480}/E_{664} при разном наборе пигментов. Обсуждаются области ее применения.

В последнее время часто используют пигменты фитопланктона в качестве показателей экологического состояния водоемов. Это оказалось возможным благодаря тесной взаимосвязи между функционированием различных звеньев трофической цепи, формирующих качество воды, и сравнительной простоте методов определения хлорофилла. Однако существуют трудности, связанные с расшифровкой информации о состоянии водоема по пигментным характеристикам. Для решения этой задачи полезны модели пигментного состава фитопланктона.

В основу предлагаемой пигментной модели положены отличия коротковолновой области спектров поглощения ацетоновой вытяжки из фитопланктона разного состава. В качестве критерия различий выбрано отношение оптических плотностей экстрактов пигментов на длинах волн 450 и 480 нм, которое у сине-зеленых водорослей близко к единице, у остальных заметно выше. Различие связано с составом и оптическими свойствами пигментов, входящих в фотосинтетический аппарат разных групп водорослей.

Известно, что водоросли содержат богатый набор пигментов, одни из которых присутствуют у всех видов, другие — у представителей отдельных систематических групп. Общими из липофильных пигментов, извлекаемых ацетоном и другими органическими растворителями, являются хлорофилл „а” и β -каротин. Отличительные свойства пигментных комплексов проявляются за счет специфических пигментов. У сине-зеленых это миксоксантофилл, осциллоксантин, миксоксантин, эхинонен, у зеленых — хлорофилл „b”, лютеин, неоксантин, виолаксантин, у диатомовых —

хлорофилл „с“, фукоксантин, неофукоксантин, диадиноксанти́н, диатоксанти́н [9]. Отношение оптической плотности ацетонового экстракта пигментов на длинах волн 450 и 480 нм, выбранное в качестве критерия различия водорослей (индекс E_{450}/E_{480}), имеет максимальные величины почти у всех диатомовых и минимальные — у сине-зеленых (табл. 1).

Таблица 1

Величина индекса E_{450}/E_{480} некоторых пигментов диатомовых, зеленых и сине-зеленых водорослей

Пигмент	E_{450}/E_{480}	Растворитель	Источник
Хлорофилл		90 %-ный ацетон	[5]
„сз“	42,6	Диэтиловый эфир	[11]
„сз“	4,6	Диэтиловый эфир	
„с2“	9,1	90 %-ный ацетон	[5]
„с“	10,0		[10]
„с“	14,6		
„b“	3,97		
„a“	4,68		
19-бутанолоксифукоксантин	1,60	Диэтиловый эфир	[11]
	1,35	Гексан	[5]
Фукоксантин	1,51	Диэтиловый эфир	[11]
	1,54		
	1,37	Ацетон	
	1,23	90 %-ный ацетон	[10]
19-гексанол-оксифукоксантин	1,36	Петролейный эфир	[5]
	1,35	Гексан	
	1,26	Этанол	
	1,13	Хлороформ	
Диадиноксанти́н	1,28	90 %-ный ацетон	[10]
Зеаксанти́н	1,16	Этанол	[5]
	1,14	Гексан	
	1,14	Не указан	[1]
Лютеин	1,14		
Лютеин-5,6-эпоксид	1,13		
Антераксанти́н	1,16		
β -каротин	1,09		
	1,10	90 %-ный ацетон	[10]
Эхиненон	1,0	Этанол	[7]
Миксоксантофилл	1,0		
Астаксанти́н	0,89	90 %-ный ацетон	[10]

Пигменты водорослей различаются формой спектра, т. е. интенсивностью поглощения на отдельных длинах волн. Однако несмотря на широкий диапазон колебаний для разных пигментов, величины их удельных коэффициентов экстинкций специфичны в целом для отделов водорослей. Сходство абсолютных значений удельных коэффициентов экстинкции у большинства пигментов

определенной группы водорослей позволяет уменьшить их набор до минимума при составлении моделей.

Учитывая особенности состава и свойств пигментов, в модельный комплекс диатомовых включили фукоксантин, диатиоксантин, β -каротин в соотношении 6:3:1 и хлорофиллы „с” и „а” в соотношении 3:10. В комплекс пигментов зеленых включили β -каротин и хлорофиллы „b” и „а” в сочетании 3:10. Для синезеленых, лишенных дополнительных хлорофиллов, взяли β -каротин и астаксантин в соотношении 1:1.

Пигментную модель фитопланктона составили исходя из оптических плотностей отдельных пигментов на длинах волн 450, 480 и 664 нм. Спектральные свойства комплекса пигментов в зависимости от состава и соотношения их концентраций оценивали по величинам индексов E_{480}/E_{664} и E_{450}/E_{480} , рассчитанных с учетом оптической плотности при длинах волн 450, 480 и 664 нм по формулам:

$$E_{450} = \alpha_a C_a + \alpha_b C_b + \alpha_{c_1} C_c + \alpha_{k_1} C_k,$$

$$E_{480} = \alpha_a C_a + \alpha_b C_b + \alpha_{c_2} C_c + \alpha_{k_2} C_k,$$

$$E_{664} = \alpha_a C_a + \alpha_b C_b + \alpha_{c_3} C_c,$$

где α — коэффициенты удельного поглощения света хлорофиллами „а”, „b”, „с” и каротиноидами при соответствующих длинах волн, C — концентрация пигментов, E — оптическая плотность, a — хлорофилл „а”, b — хлорофилл „b”, c — хлорофилл „с”, k — каротиноиды, 1, 2, 3 — указатели для пигментных характеристик на длине волны 450, 480 и 664 нм. Содержание хлорофилла „а” приняли за 1 во всех случаях. Удельные коэффициенты экстинкции пигментов в ацетоне взяли из работ [3, 6, 8, 10] в виде условных показателей (табл. 2).

Индексы E_{450}/E_{480} и E_{480}/E_{664} использованы для построения кривых, отражающих изменения их величин при заданном сочетании концентраций хлорофиллов („а”, „b”, „с”) и основных каротиноидов, но различном соотношении каротиноидов и хлорофилла „а” (см. рисунок). Нижние кривые (1—3) ограничивают область вероятного доминирования пигментов синезеленых водорослей, верхние (5—7) — диатомовых. Промежуточные кривые обозначают переход от пигментного комплекса синезеленых через комплекс зеленых, синезеленых и диатомовых к абсолютному диминированию пигментов диатомовых.

Точки, соответствующие одинаковому соотношению концентраций каротиноидов (C_k) и хлорофилла „а” ($C_{хл}$) при разном сочетании хлорофиллов („а”:„b”:„с”), соединены линиями, кото-

Удельные коэффициенты поглощения света (л/(г·см))
хлорофиллами и каротиноидами в ацетоне

Таблица 2

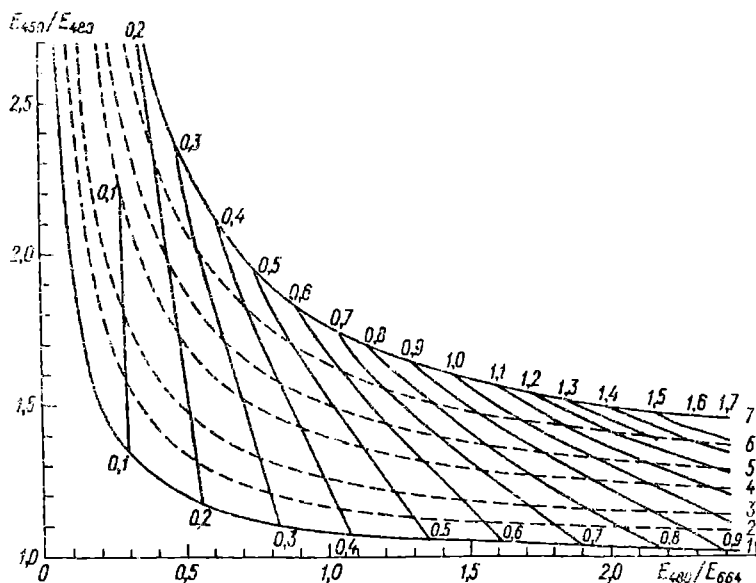
Пигмент	Удельные коэффициенты на длинах волн			Источник
	450 нм	480 нм	664 нм	
Хлорофилл				
„а”	11,7	2,5	87,7	[6,10]
„b”	54,0	13,6	6,5	[10]
„с”	140,0	9,6	1,1	[3,10]
Каротиноид				
β-каротин	244,0	223,0		[10]
Фукоксантин	106,0	87,3		[3,8]
Диатриоксантиин	239,0	186,0		[10]
Астаксантиин	221,0	249,0		[10]

Примечание. Из-за отсутствия в литературе точных удельных коэффициентов экстинкции на длинах волн 450 и 480 нм были взяты их условные значения из работы Ричардса и Томпсона [10]. Если коэффициенты Ричардса и Томпсона значительно отличались от более новых, были внесены коррективы.

рые показывают направленность изменений показателя $C_k/C_{хл}$ при смене пигментного комплекса сине-зеленых на комплекс смешанного фитопланктона вплоть до абсолютного преобладания пигментов диатомовых водорослей.

Составленную модель предлагается использовать для интерпретации данных по пигментному индексу E_{480}/E_{664} , впервые предложенному в работе [4], и соотношению концентраций каротиноидов и хлорофилла „а”. Индекс E_{480}/E_{664} часто применяется как эквивалент соотношения концентраций каротиноидов и хлорофилла „а”. Однако модель показывает, что при одной и той же величине этого индекса соотношение концентраций желтых и зеленых пигментов у диатомовых выше, чем у сине-зеленых водорослей. Поэтому нельзя отождествлять индекс E_{480}/E_{664} и отношение $C_k/C_{хл}$.

Модель полезна при оценке соотношения концентраций каротиноидов и хлорофилла „а”, особенно для фитопланктона смешанного состава. Если необходимо получить представление об абсолютной концентрации суммы каротиноидов (C_k), следует воспользоваться простым соотношением: $C_k = A C_{хл}$, где $C_{хл}$ — концентрация хлорофилла „а”, рассчитанная по формулам стандартного спектрофотометрического метода, A — соотношение концентраций каротиноидов и хлорофилла, полученное по модели. Чтобы учесть влияние фкопигментов на индекс E_{480}/E_{664} , можно



Пигментная модель фитопланктона.

Цифры на рисунке — отношение концентраций каротиноидов и хлорофилла „а“. Кривые построены по точкам, соответствующим следующему содержанию (%) пигментов диатомовых, зеленых и сине-зеленых:

Кривая	Диатомовые	Зеленые	Сине-зеленые
1	—	—	100
2	10	10	80
3	20	20	60
4	40	30	30
5	50	40	10
6	80	10	10
7	100	—	—

вместо E_{664} использовать оптическую плотность подкисленного экстракта на этой же длине волны, умноженную на 1,7.

Пигментная модель может быть использована также для выявления начальных этапов цветений водоема сине-зелеными водорослями, нарастание вклада биомассы которых обнаруживается по уменьшению индекса E_{450}/E_{480} .

Для использования модели необходимо измерить оптическую плотность ацетонового экстракта из сестона на длинах волн 664, 480 и 450 нм, рассчитать отношения E_{450}/E_{480} и E_{480}/E_{664} и найти необходимый ответ на графиках (см. рисунок). Процедура

получения экстракта и правила работы на приборе такие же, как для стандартного спектрофотометрического метода [2].

Диапазон оптической плотности экстрактов, в пределах которого не отмечается искажение индексов E_{450}/E_{480} и E_{480}/E_{664} шире (0,05—0,75), чем для стандартного метода (0,2—0,8), что важно при исследовании вод с повышенным содержанием неорганической взвеси, затрудняющей фильтрацию необходимого объема пробы. Сильно разбавленные ($E > 0,02—0,03$) и концентрированные ($E > 1,3—2,0$) растворы пигментов не пригодны для измерений оптической плотности из-за нарушений в них пропорциональности между поглощением света и концентрацией вещества.

Таким образом, с помощью пигментной модели без проведения дополнительного анализа можно получить информацию, полезную для оценки экологического состояния водоема. Дальнейшее изучение причин колебаний пигментных индексов позволит расширить сферы применения подобного моделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Корнюшенко Г. А., Попова И. А. Сравнительная характеристика методов бумажной и тонкослойной хроматографии каротиноидов зеленого леса // Физиология растений. 1970. Т. 17, вып. 6.
2. Сигарева Л. Е. Спектрофотометрический метод определения пигментов в смешанном экстракте фитопланктона // Наст. сборник.
3. Abayachi J. K., Riley J. P. The determination of phytoplankton pigments by high-performance liquid chromatography // Anal. Chim. Acta. 1979. Vol. 107.
4. Burkholder P. R., Burkholder L. M., Rivero J. A. Chlorophyll *a* in some corals and marine plants // Nature. Lond. 1959. Vol. 183.
5. Gieskes W. W. C., Kraay G. W., Nontji A., Setiapermana D., Sutomo. Monsoonal alternation of a mixed and a layered structure in the phytoplankton of the euphotic zone of the Banda sea (Indonesia): a mathematical analysis of algal pigment fingerprints // Neth. J. Sea Res. 1988. Vol. 22 (2).
6. Lorenzen C. J., Jeffrey S. W. Determination of chlorophyll in seawater // UNESCO technical papers in marine sciences. Paris, 1980. N 35.
7. Montoura R. F. C., Llewellyn C. A. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown, products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography // Anal. Chim. Acta. 1983. Vol. 151.
8. Parsons T. R., Strickland J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids // J. Mar. Res. 1963. Vol. 21, N 3.
9. Raymont J. (Раймонт Дж.) Планктон и продуктивность океана. М., 1983. Т. 1.
10. Richards F. A., Thompson T. G. The estimation and characterization of plankton population by pigment analyses. II. A spectrophotometric method to the estimation of plankton pigments // J. Mar. Res. 1952. Vol. 11, N 2.
11. Stauder J. L., Jeffrey S. W. Photosynthetic pigments in fifty one species of marine diatoms // J. Phycol. 1988. Vol. 24.

В. А. Елизарова

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН*

ХЛОРОФИЛЛ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ БИОМАССЫ ФИТОПЛАНКТОНА

На основании литературных и собственных данных показаны значительные колебания соотношения хлорофилла „а” и биомассы водорослей во времени и пространстве, что препятствует использованию данного показателя в качестве единой меры количества фитопланктона в различных экологических условиях.

Идея использования содержания хлорофилла „а” в качестве показателя количественного развития фитопланктона принадлежит советским ученым Е. М. Крепсу и Н. А. Вержбинской [10]. Английский океанолог Харви [29] осуществил ее при изучении динамики фитопланктона, рассматривая наличие пигмента и единый признак для всех групп водорослей. В настоящее время определение хлорофилла в единице объема воды прочно вошло в практику наблюдений за уровнем развития фитопланктона во времени и пространстве. Из-за доступности, оперативности и достаточно высокой точности инструментальных измерений концентраций хлорофилла их пытались использовать и как меру биомассы фитопланктона. Учет биомассы стандартным методом, как известно, субъективен и требует хорошего знания альгофлоры. Систематическое накопление сведений по соотношению концентрации пигмента и биомассы фитопланктона начато по инициативе Г. Г. Винберга [1, 2] в начале 50-х годов и оставалось важным направлением гидробиологических исследований в течение двух последующих десятилетий. Однако переходный коэффициент между хлорофиллом и биомассой, пригодный для водоемов разного типа и даже для каждого конкретного, не был выведен. Оказалось, что содержание хлорофилла в единице биомассы сильно колеблется в зависимости от самых разнообразных биотических и абиотических факторов, важнейшими из которых являются свет, концентрация в воде биогенных элементов и таксономический состав водорослей. Тем не менее хлорофилловый метод оп-

ределения биомассы фитопланктона не перестает обсуждаться, судя по публикациям самых последних лет. Кроме того, содержание пигментов в единице биомассы — одна из функциональных характеристик фитопланктона, детальное изучение которых приобрело актуальность в связи с проблемами экологического мониторинга пресных вод.

В настоящее время преобладает мнение, что удельное содержание хлорофилла зависит от уровня биомассы фитопланктона, с увеличением которой оно убывает [6, 8, 9, 12, 20, 21, 23, 26]. Т. М. Михеева [17], изучая фитопланктон белорусского оз. Дривяты, пришла к выводу, что удельное содержание хлорофилла начинает уменьшаться лишь с определенного значения биомассы, ниже которого оно постоянно. Это заключение повторяется почти во всех отечественных работах, если в них затрагивается вопрос о количестве пигмента в единице биомассы фитопланктона. По нашим данным [6], снижение распространяется на весь диапазон наблюдаемых в водосеме величин биомассы и особенно заметно в области низких значений. Однако при биомассах, типичных для отдельно взятых сезонов, оно незначительно, коэффициенты корреляции между концентрацией хлорофилла и биомассой высокие, более 0,7, что позволяет оценивать ее по хлорофиллу. Статистически связь между концентрацией хлорофилла и биомассой фитопланктона тоже оценивается практически как прямолинейная.

Снижение рассматриваемого показателя с увеличением биомассы фитопланктонного сообщества отражает ухудшение физиологического состояния доминирующих популяций в процессе их нарастания, которое завершается массовым отмиранием, совпадающим с моментом максимальной численности [7]. Позднее, на стадии спада биомассы, содержание хлорофилла в фитопланктоне повышается снова [8], поскольку остаются в основном живые клетки, в том числе новых активно метаболизирующих видов [7]. В культурах планктонных диатомовых водорослей удельное содержание хлорофилла значительно уменьшалось по мере нарастания плотности суспензий [31].

Содержание хлорофилла в единице биомассы зависит от таксономического состава фитопланктона, в первую очередь от систематической принадлежности водорослей доминирующей группы. По одним данным, оно близко для диатомовых и цианобактериальных (сине-зеленых) водорослей: соответственно 0,14—0,37 % и 0,22—0,28 % в Рыбинском водохранилище [6] и 0,4—0,6 % и 0,5—0,6 % в шведском оз. Меларен. Вывод подтверждают результаты анализа монокультур массовых планктонных диатомей (*Stephanodiscus hantzschii*, *Tabellaria fenestrata*, *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*, *Diatoma elongatum*) и цианобактерий (*Anabaena spiroides*, *A. schermatiae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *M. wesenbergii*) [18]. Согласно ра-

ботам других авторов [3, 16, 22], „цианобактериальный” фитопланктон сильно уступает „диатомовому” по содержанию пигмента на единицу биомассы. В отношении зеленых водорослей результаты исследований однозначны — эти формы в 4—5 раз богаче диатомовых и цианобактерий [3, 18, 27]. Обильнее наделены пигментами также криптофитовые. В греческом оз. Вольви именно у них максимальная доля хлорофилла в биомассе, им уступают диатомовые и сине-зеленые [30]. В случае доминирования криптофитовых в оз. Меларен в фитопланктоне найдено 0,5—0,7 % хлорофилла, а диатомовых — 0,4—0,6 %. То же самое наблюдалось в оз. Венерн — 1,1 % и 0,3—0,5 % соответственно при массовом развитии криптофитовых и диатомовых [37]. Динофитовые водоросли, например, характеризуются пониженным содержанием хлорофилла. Так, в оз. Плещеево в летнем фитопланктоне, облик которого определяет *Ceratium hirundinella*, содержится 0,1 % хлорофилла, а в весеннем диатомово-криптофитовом — 0,5—1,1 % [24].

Доля водорослей, богатых хлорофиллом, сказывается на содержании пигмента в единице общей биомассы фитопланктона. Например, в Рыбинском водохранилище при обычной доле зеленых 1—10 % всей биомассы, исследуемый показатель составляет 0,14—0,37 %, а при повышенной до 20 % — 0,5—0,8 % [5]. То же отмечено в днепровских водохранилищах [14]. По нашему мнению, это одна из причин высокого содержания хлорофилла в фитопланктоне эвтрофных и эвтрофирующихся водоемов, где зеленые могут удовлетворять повышенную потребность в азоте [4], а криптофитовые — в органических веществах [28].

Имеется много работ, показывающих, что в эвтрофных водоемах фитопланктон содержит больше хлорофилла, чем в мезотрофных и олиготрофных. Так, в перифитоне польских олиготрофных озер содержится в среднем 0,44 % хлорофилла от органического вещества, а в эвтрофных — 0,77 % [36]. Более насыщен хлорофиллом фитопланктон высокоэвтрофного оз. Норвикен в Швеции по сравнению с оз. Меларен [25, 37]. Больше хлорофилла в фитопланктоне слабоэвтрофного Иваньковского водохранилища, чем мезотрофного Рыбинского и олиготрофного Онежского озера [6], в более продуктивных водоемах Карельского перешейка и Чехословакии фитопланктон содержит больше хлорофилла, чем в малопродуктивных [21]. Это объясняется тем, что удельное содержание хлорофилла в клетках водорослей прямо зависит от обеспеченности их биогенными элементами [34, 35, 37]. Однако несомненно и значение флористического состава, в котором увеличивается доля богатых хлорофиллом видов.

Содержание хлорофилла в единице биомассы фитопланктона варьирует в течение года, изменяясь в некоторых водоемах более чем на 2 порядка [26, 33]. В Рыбинском водохранилище при типичных для отдельно взятых сезонов биомассах оно составляет

0,27—0,35 % весной, 0,43—0,51 % в начале лета, 0,20—0,60 % в разгар лета, 0,14—0,22 % осенью, 0,25—0,31 зимой [5].

Обращают на себя внимание разные данные для весны и осени, хотя в обоих случаях доминируют диатомовые. Различие может быть обусловлено спецификой их видового состава [5]. Однако результаты анализа культур этих водорослей пока не позволяют достоверно утверждать о разном содержании у них хлорофилла [18]. Для массовых цианобактерий установлено значительное различие этого показателя (0,2—0,9 %), причем как на природных, так и лабораторных популяциях [11]. Содержание хлорофилла может различаться даже у таксономически близких видов, что показано на примере семи представителей из рода *Scenedesmus* [32]. Правда, отмечено, что такие различия могут быть меньше, чем изменения у одного и того же вида при разной обеспеченности питанием, т. е. дивергентная адаптация сильнее специфической.

Установлена обратная зависимость содержания хлорофилла в биомассе фитопланктона от интенсивности светового потока [15, 34, 35]. Возможно, высокое содержание пигмента в зимнем фитопланктоне оз. Красного [20] и Братского водохранилища [9] объясняется адаптацией к слабому освещению, а низкое в популяции *Microcystis aeruginosa* в одном из южноафриканских озер [38] — приспособлением к высокому уровню освещенности. Отмечены дневные колебания содержания хлорофилла в клетках водорослей [13, 19].

Таким образом, анализ накопленных данных о соотношении между биомассой водорослей и хлорофиллом еще раз убеждает в том, что этот показатель не может быть единой мерой количества фитопланктона в различных экологических условиях. Однако его использование для приближенной оценки обилия фитопланктона при характерных условиях развития в конкретных водоемах вполне приемлемо.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Винберг Г. Г. Содержание хлорофилла как показатель количественного развития фитопланктона // Третья экол. конф.: Тез. докл. Киев, 1954. Ч. 4.
2. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
3. Гольц В. М., Гаевский Н. А., Шатров И. Ю., Попельницкий В. А., Гольд З. Г. Хлорофилл „а“ и автоматизированный мониторинг фитопланктона // Проблемы экологии Прибайкалья: Тез. докл. к 3 Всес. науч. конф. Иркутск, 1988. Ч. 2.
4. Гусева К. А. „Цветение“ воды, его причины, прогноз и меры борьбы с ним // Тр. Всес. гидробиол. о-ва. 1952. Т. 4.
5. Елизарова В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в единице биомассы фитопланктона Рыбинского водохранилища // Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Рыбинск, 1974.
6. Елизарова В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоемов разного типа: Автореф. дис....канд. биол. наук. М., 1975.

7. Елизарова В. А. О выживании летом весенних форм планктонных диатомей // Флора и растительность водоемов бассейна Верхней Волги. Рыбинск, 1979.
8. Елизарова В. А. К вопросу о содержании хлорофилла в пресноводном фитопланктоне // Биология внутренних вод; Информ. биол. Л., 1983. № 58.
9. Измествева Л. Р. Содержание хлорофилла „а“ в водоемах байкальского региона: Автореф. дис....канд. биол. наук. Киев, 1983.
10. Крепс Е. М., Вержбинская Н. А. (Kreps E., Verjbinskaya N.) Seasonal changes in the phosphate and nitrate content and hydrogen ion concentration in the Barents sea // J. Conseil perman. Internat. explorat. mer. 1930. Vol. 5.
11. Курейшевич А. В. Содержание хлорофилла „а“ в культурах синезеленых водорослей с разным объемом клеток // Гидробиол. журн. 1980. № 5.
12. Курейшевич А. В. Пигменты фитопланктона и факторы, влияющие на их содержание в водоеме (на примере днепровских водохранилищ): Автореф. дис....канд. биол. наук. Киев, 1983.
13. Курейшевич (Лишук) А. В. К вопросу о суточной динамике содержания фотосинтетических пигментов водорослей // Проблемы экологии Прибайкалья: Тез. докл. к 3 Всес. науч. конф. Иркутск, 1988. Ч. 2.
14. Курейшевич А. В., Пахомова М. Н. Некоторые факторы, влияющие на относительное содержание хлорофилла „а“ в биомассе фитопланктона // XIII конф. по спорным растениям Средней Азии и Казахстана: Ташкент, 4—6 сент. 1986 г.: Тез. докл. Ташкент, 1989.
15. Мережко А. И. Влияние светового режима на жизнедеятельность *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenk. и *Anabaena variabilis* Kutz // „Цветение“ воды. Киев, 1969. Ч. 2.
16. Милиус А., Кываск В. Связь между концентрацией хлорофилла „а“ и биомассой фитопланктона в малых озерах Эстонии // Изв. АН ЭССР. Биол. 1987. Т. 36, № 1.
17. Михеева Т. М. Оценка продукционных возможностей единицы биомассы фитопланктона // Биологическая продуктивность эвтрофного озера. М., 1970.
18. Пырина И. Л., Елизарова В. А. Спектрофотометрическое определение хлорофиллов в культурах некоторых водорослей // Биология и продуктивность пресноводных организмов. Л., 1971.
19. Стельмах Л. В. Суточные изменения относительного содержания хлорофилла „а“ в культурах морских планктонных водорослей // Экология моря. Киев, 1982. № 11.
20. Трифонова И. С. Фитопланктон и его продукция // Биологическая продуктивность оз. Красного и условия ее формирования. Л., 1976.
21. Трифонова И. С., Десортова Б. Хлорофилл как мера биомассы фитопланктона в водоемах разного типа // Гидробиологические процессы в водоемах. Л., 1983.
22. Щур Л. А. Взаимосвязь между гидрооптическими и гидробиологическими характеристиками фитопланктона в пресных водоемах (на примере Красноярского водохранилища и оз. Таймыр): Автореф. дис....канд. биол. наук. Красноярск, 1986.
23. Экология фитопланктона Куйбышевского водохранилища. Л., 1989.
24. Экосистема озера Плещеево. Л., 1989.
25. Ahlgren G. Limnological studies of lake Norrviken, a eutrophicated swedish lake. II. Phytoplankton and its production // Schweiz. Z. Hydrobiol. 1970. Vol. 32, N 2.
26. Desortova B. Relationship between chlorophyll a concentration and phytoplankton biomass in several reservoirs in Czechoslovakia // Int. Rev. ges. Hydrobiol. 1981. Vol. 66, N 2.
27. Felföldy L., Szabo E., Toth L. Egyesült algak pigment tartamáról // Magyar tud. akad. Tihanyi biol. kutatint evk. 1962. Vol. 29.
28. Fogg G. E. Algal cultures and phytoplankton ecology. Wisconsin, 1975.
29. Harvey H. W. Measurement of phytoplankton population // J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 1934. Vol. 19.

30. Moustaka-Goumi M. Temporal and spatial distribution of chlorophyll a in lake Volvi, Greece // Arch. Hydrobiol., Suppl. 1989. Vol. 82 N 4.
31. Myklesstad S. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture // J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 1974. Vol. 15.
32. Nagy-Toth F., Bercea V., Barna A., Stirban M. The dynamics of photosynthetic pigments and the productivity of some *Scenedesmus* species // Rev. roum. biol. Ser. biol. veg. 1980. Vol. 25, N 1.
33. Pridmore R. D., Hewitt J. E. Chlorophyll „a” as an indicator of phytoplankton cell volume in 12 lakes, North Island^ New Zealand // N. Z. J. Bot. 1984. Vol. 22, N 2.
34. Steele J. H. Environmental control of photosynthesis in the sea // Limnol., Oceanogr. 1962. Vol. 7.
35. Steele J. H., Baird I. E. The chlorophyll „a” content of particulate organic matter in the Northern North Sea // Limnol., Oceanogr. 1965. Vol. 10.
36. Szczepanski A. Production of reed periphyton in various types of lakes // Bull. de l'academic Polonaise de Sciences, C I. II. 1968. Vol. 16, N 6.
37. Tolstoy A. Chlorophyll a in relation to phytoplankton volume in some Swedish lakes // Arch. Hydrobiol. 1979. Bd 85, H. 2.
38. Zohary T., Roberts R. D. Diurnal mixed layers and the long-term dominance of *Microcystis aeruginosa* // J. Plankton Res. 1989. Vol. 11, N 1.

И. Л. Пырина

*Институт биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанова РАН*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДВОДНОЙ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИ АКТИВНОЙ РАДИАЦИИ

Описаны аппаратура и методы для определения энергии подводной облученности фотосинтетического диапазона длин волн.

Вопрос о необходимости изучения фотосинтетически активной радиации (ФАР), проникающей в водоемы, поставлен около 30 лет назад [19, 20]. С тех пор исследования в этом направлении значительно усилились. Однако методика измерения энергии подводной ФАР разрабатывалась главным образом на морских водоемах, в пресных водах подобные работы менее распространены [18]. В нашей стране они вообще единичны, что связано с отсутствием у гидробиологов стандартной аппаратуры для измерения энергетической освещенности в области ФАР, простой и удобной при работе с небольшими плавсредств. Те приборы, которые могут быть использованы для получения таких данных [8, 9, 12, 14], уникальны. Зарубежные модели, выпускаемые в США — типа Li-Cor (Li-192SB и Li-193SB, Линкольн, Небраска), QSP-200 (Сан-Диего, Калифорния) или в Швеции — QSM-2500, Techium Instruments [17, 18], малодоступны.

Сложность изучения подводных световых условий как фактора первичной продукции фитопланктона обусловлена тем, что проходящая сквозь воду лучистая энергия Солнца изменяется не только количественно, но и в качественном отношении. Вода, будучи своеобразным светофильтром, селективно ослабляет проходящее через нее излучение, задерживает в первую очередь крайние синие и красные лучи, а наиболее полно пропускает зеленые. Кроме того, меняются угловые характеристики проникающего излучения. Непрерывно изменяется и интенсивность поступающей в воду солнечной радиации в течение дня в зависимости от высоты Солнца над горизонтом и условий облачности. В идеале надо было бы учитывать все эти особенности подводного светового

режима, чем и обусловлены трудности создания необходимых приборов.

Основные требования, которые следует соблюдать при проведении подводных световых измерений для целей изучения первичной продукции, сводятся к следующему [7].

1. Необходимо учитывать излучение в области длин волн от 400 до 700—800 нм, но лучше в принятом для ФАР диапазоне — $\lambda = 380—710$ нм [13].

2. Измерять разнонаправленное излучение (облученность), поступающее с полусферы, или полную сферическую облученность.

3. Суммировать энергию за время экспозиции.

4. Результаты выражать в энергетических единицах — ваттах, джоулях или микроэйнштейнах на 1 м^2 .

Среди существующих методов измерения лучистой энергии в водоеме можно выделить прямые, при которых учитывается энергия облученности непосредственно на исследуемой глубине, и косвенные, когда энергия радиации в абсолютных единицах измеряется на воздухе, а на глубинах водоема рассчитывается по относительным данным о ее проникновении или по первичным гидрооптическим характеристикам водной массы.

Из непосредственных методов измерения лучистой энергии в водоеме наибольшее распространение получили основанные на термоэлектрических и фотоэлектрических приборах. Преимущество приборов, в которых используется термоэлектрический эффект, состоит в том, что они практически неселективны в широком диапазоне длин волн. Поэтому к ним легко подобрать светофильтры для измерения энергии облученности необходимого диапазона длин волн. Недостатком таких приборов является малая интегральная чувствительность. Фотоэлектрические приборы обладают высокой чувствительностью, но они селективны. Для них обязательны сведения о спектральной чувствительности фотодетектора, чтобы подобрать светофильтры, в сочетании с которыми можно было бы вырезать исследуемый участок спектра солнечной радиации.

На фотоэлектрическом принципе измерения энергии облученности построен подводный фотоинтегратор, применяемый при изучении первичной продукции фитопланктона [8, 9]. Прибор сконструирован на базе фотоинтегратора Л. Н. Белла [3] и чувствителен к излучению близкой к ФАР области спектра 380—800 нм. Это достигается комбинацией вакуумного фотоэлемента (марки ЦВ-3) со стеклянными светофильтрами СЗС-14 и БС-8. Датчик рассчитан на измерение лучей с полусферы, собираемых выпуклым иллюминатором из молочного органического стекла (при соблюдении косинусного закона), благодаря чему уменьшается погрешность за счет рассеянного излучения, характерного для природных вод. Регистрирующее устройство, включающее электромеханический счетчик или цифровой индикатор,

обеспечивает непрерывную регистрацию и автоматическое суммирование энергии радиации. При необходимости измеряется излучение более узких спектральных диапазонов, для чего вместо БС-8, отсекающего от общего спектра Солнца участок с длинами волн более 380 нм, берется светофильтр, пропускающий меньшую часть спектра. Так, ЦВ-3 в сочетании с СЗС-14 + БС-8 регистрирует излучение в области 380—800 нм, с СЗС-14 + ЖС-17 — 480—800 нм, СЗС—14 + КС—10 — 600—800 нм, с СЗС—14 + КС—19 — 680—800 нм [9]. Такой способ позволяет измерить энергию постепенно суживаемых участков спектра солнечной радиации и тем самым проследить ее селективное ослабление водной средой.

Градуируется фотоинтегратор актинометрическим методом — по прямой солнечной радиации, из спектра которой вырезается участок, соответствующий спектральной чувствительности датчика [8]. Это достаточно точный, но вместе с тем доступный метод, в отличие от физического [14] не требующий специальной оптической аппаратуры. Энергия необходимого участка спектра измеряется стандартным актинометром со светофильтрами [13, 15]. Ее величина находится по разности радиации, пропущенной специфическим светофильтром датчика, т. е. БС-8 или другими „отрезающим” фильтром, которым определяется спектральная чувствительность прибора, и инфракрасным светофильтром ИКС-1. Например, для диапазона длин волн 380—800 нм берется разность энергии радиации под светофильтрами БС-8, пропускающими в основном излучение с длинами волн более 380 нм, и ИКС-1, через который проходят длинноволновые лучи начиная приблизительно с λ -800 нм. При этом вводится поправка на излучение за пределами эффективной длины пропускания фильтра, а также на поглощенное им в области пропускания с учетом спектральных характеристик стекла и падающей на его поверхность солнечной радиации [4]. Спектр солнечной радиации берется по модельным расчетам для условий среднего оптического режима атмосферы [1]. Прямые лучи отделяются от рассеянных с помощью зачерненной внутри трубки с диафрагмами, рассчитанной на угол зрения 10° , которая насаживается на датчик и вместе с ним посредством специального механизма нацеливается на Солнце. При ее изготовлении, выполненном по рекомендациям Ю. Д. Янишевского, учтены геометрические размеры трубки актинометра: у входной диафрагмы отверстие соответствует диаметру иллюминатора датчика, у выходной — вдвое больше, длина трубки в 5,72 раза больше диаметра иллюминатора.

В водоем прибор опускается подвешенным на поплавке и вместе с ним отводится от судна (или буя) на расстояние 10—15 м.

В тех случаях, когда подводными световыми измерениями сопровождаются опыты по фотосинтезу, непосредственно на приборе закрепляются склянки с пробами воды. Так комплектуется несколько установок по числу горизонтов, на которых производится

определение фотосинтеза. Обычно это 5—7 горизонтов, расстояние между которыми намечается в зависимости от прозрачности воды. Например, при прозрачности по белому диску Секки около 2 м измерения проводятся на глубинах 0—0,5, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 м. Приборы со склянками опускаются на каждый из этих горизонтов и экспонируются там в течение всего опыта. Такого рода эксперименты весьма громоздки и могут быть рекомендованы лишь при специальных исследованиях света как фактора подводного фотосинтеза. Однако это единственный способ, позволяющий получить надежный материал для количественной оценки световых зависимостей фотосинтеза планктона, которые лежат в основе современных математических моделей этого процесса.

При невозможности измерить энергию проникающей радиации используется расчетный метод ее определения. В этом случае за основу берется энергия приходящей суммарной солнечной радиации, от которой переходят к ФАР, пользуясь соответствующими коэффициентами перехода. В гидробиологических работах принято считать, что доля ФАР составляет 46 % интегральной по спектру радиации [22], хотя в зависимости от соотношения прямого и рассеянного излучения может различаться от 26 до 64 % [13]. Над водоемами ее величины составили 46—57 % [10].

Энергию приходящей суммарной солнечной радиации определяют стандартными актинометрическими приборами, например пиранометром с электролитическим интегратором или с самописцем [15]. Можно использовать данные по ближайшей актинометрической станции. Однако если она находится не на берегу водоема, а на некотором расстоянии (не более 150 км), следует учитывать условия облачности и только при близком ее состоянии над водоемом и в районе станции пользоваться данными последней [6].

По величине приходящей радиации и альбедо поверхности воды, подбираемого в литературных источниках, находят вошедшую в воду радиацию. Дальнейшие расчеты ее проникновения делают по результатам измерений (%) распределения ФАР по глубинам или показателям ее вертикального ослабления согласно закону Бугера:

$$I_Z = I'_0 e^{-\alpha Z}, \quad (1)$$

где I_Z — энергия радиации на глубине Z , I'_0 — энергия вошедшей в воду радиации, α — показатель ее вертикального ослабления.

Показатель вертикального ослабления солнечной радиации (α) — одна из наиболее важных и необходимых оптических характеристик водной массы. Как известно, это величина, обратная расстоянию, на котором проникающая радиация в результате со-

вместного действия поглощения и рассеяния ослабляется в 10 раз, если рассчитана по основанию десятичных логарифмов (или приблизительно в 2,7 раза — при основании натуральных логарифмов):

$$\alpha \text{ (м}^{-1}\text{)} = \frac{1}{Z_2 - Z_1} \log \frac{I_1}{I_2}, \quad (2)$$

где $Z_2 - Z_1$ — толщина слоя воды (м), I_1 и I_2 — облученность на верхней и нижней границе слоя.

Необходимо строго различать и указывать, при основании каких логарифмов рассчитана величина α . Показатель вертикального ослабления, полученной по основанию натуральных логарифмов, в 2,3 раза выше, чем в случае десятичных логарифмов: $\alpha (\ln) = 2,3 \alpha (\lg)$.

Показатель вертикального ослабления ФАР можно получить измерениями термоэлектрическим или фотоэлектрическим приборами с регистрацией показаний в относительных единицах, но при обязательной равномерной спектральной чувствительности датчика. Можно также воспользоваться литературными данными об этом показателе, например приведенными для оптически различных вод в работе Кирка [18].

Практические осложнения при расчетах энергии проникающей радиации по показателю вертикального ослабления связаны с подбором характерной для данной водной массы величины. Это обусловлено тем, что в природных водах ход спектрально сложного потока солнечных лучей отклоняется от описываемого законом Бугера, который справедлив лишь применительно к монохроматическому излучению. Поэтому рассчитанные по классической формуле Бугера величины показателя вертикального ослабления солнечной радиации различаются по глубине — в верхних слоях они больше, чем в нижних. Чтобы преодолеть трудности выбора нужной величины, проводят измерения в нескольких узких участках спектра или в области минимального ослабления света, для которой значения α близки по всей глубине, затем рассчитывают этот показатель для интегрального потока ФАР [16, 21]. Однако параметры такого рода расчетов недостаточно изучены для оптически различных типов природных вод, что вносит дополнительные отклонения в получаемые результаты.

Учитывая сложность получения точных результатов расчета подводной ФАР, можно рекомендовать использование расчетных данных об интегральной по спектру солнечной радиации. Тем более, что последняя при прохождении сквозь воду быстро теряет крайние ультрафиолетовые и инфракрасные лучи и на сравнительно небольшой глубине становится близкой к ФАР. Отклонения в проникновении спектрально сложного потока радиации от

подчиняющегося закону Бугера хода монохроматического излучения может быть уменьшено, если в экспоненту формулы (1) ввести параметр Z в степени n меньше 1:

$$I_Z = I'_0 e^{-\alpha Z^n}. \quad (3)$$

Умножаем на величину, равную Z^n , компенсируется снижение показателя α по мере проникновения солнечной радиации в глубь водоема и селективного ее ослабления водной средой. Величина n меняется от 0,6 при 10° цветности воды по платиново-кобальтовой шкале до 0,8 при 50° [11].

Для интегрального по спектру потока радиации показатель вертикального ослабления может быть определен с достаточной в гидробиологических работах точностью на основании прозрачности воды, измеренной диском Секки [2, 5].

Таким образом, наиболее полная информация об условиях освещения, в которых протекает фотосинтез фитопланктона, может быть получена непосредственными измерениями ФАР. Они обязательны в работах по экологии подводного фотосинтеза, и при их проведении следует стремиться измерять энергетическую освещенность на уровне испытываемых проб, несмотря на трудности этих измерений. В работах же, направленных на оценку уровня первичной продукции в том или ином водоеме, можно ограничиться относительными данными подводных световых измерений, а энергию радиации в абсолютных единицах получать на воздухе. При этом можно определять энергию проникающей радиации и расчетными методами, опираясь на результаты простых измерений прозрачности воды и актинометрические данные Гидрометеослужбы. Однако в любом случае при изучении первичной продукции фитопланктона необходимо оценивать энергетическую освещенность водной массы, на которой основано понимание закономерностей подводного фотосинтеза, моделирование этого процесса и функционирования экосистемы водоема в целом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авасте О., Молдау Х., Шифрин К. С. Спектральное распределение прямой и рассеянной радиации // Исследования по физике атмосферы. Тарту, 1962. № 3.
2. Арз Ф. Л., Толстяков Д. Н. О проникновении солнечной радиации в воду // Метеорол. и гидрол. 1969. № 6.
3. Белл Л. Н., Чмора С. Н., Корнильев В. П. Прибор для измерения количества облучения (фотоинтегратор) // Физиол. раст. 1959. Т. 6, вып. 4.
4. Березкин В. А. Применение фильтров в актинометрии и методика обработки наблюдений с ними // Геофиз. сб. 1932. Т. 5, вып. 3.
5. Довгий Т. Н. Подводная солнечная радиация на Байкале. Новосибирск, 1977.

6. Кириллова Т. В. Радиационный режим озер и водохранилищ. Л., 1970.
7. Кобленц-Мишке О. И., Очаковский Ю. Е. Об измерении света при изучении первичной продукции в море // Океанология. 1966. Т. 6, вып. 3.
8. Пырина И. Л. Подводный фотоинтегратор // Гидробиол. журн. 1965. Т. 1, № 2.
9. Пырина И. Л. Спектральные измерения подводной радиации фотосинтетического диапазона длин волн фотоинтегратором со светофильтрами // Радиационные процессы в атмосфере и на земной поверхности. Л., 1974.
10. Пырина И. Л. Соотношение между видимой и общей солнечной радиацией над водоемами верховолжского бассейна // Круговорот вещества и энергии в водоемах. Иркутск, 1985. Вып. 5.
11. Пырина И. Л. Об ослаблении солнечной радиации в природных водах // Первая байкальская Верещагинская конференция: Тез. докл. Иркутск, 1989.
12. Семенченко Б. А., Мелешко И. Е., Кирмалов Р. Л., Владимирова И. А. Подводный регистрирующий спектрометр с дистанционным управлением // Метеорол. и гидрол. 1971. № 4.
13. Тооминг Х. Г., Гуляев Б. И. Методика измерения фотосинтетически активной радиации. М., 1967.
14. Чехин Л. П. Световой режим водоемов. Петрозаводск, 1987.
15. Янишевский Ю. Д. Актинометрические приборы и методы наблюдений. Л., 1957.
16. Jewson D. H. Light penetration in relation to phytoplankton content of the euphotic zone of Lough Neagh, N. Ireland // Oikos. 1977. Vol. 28, N 1.
17. Jewson D. H., Talling J. F., Dring M. J., et al. Measurements of photosynthetically available radiation in freshwater: Comparative tests of some current instruments used in studies of primary production // J. Plankton Res. 1984. Vol. 6, N 2.
18. Kirk J. T. O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge, 1983.
19. Report of the first meeting of the joint group of experts on photosynthetic radiant energy // UNESCO technical papers in marine sciences. 1965. N 2.
20. Report of the second meeting of the joint group of experts on photosynthetic radiant energy // UNESCO technical papers in marine sciences. 1966. N 5.
21. Talling J. F. The underwater light climate as a controlling factor in the production ecology of freshwater phytoplankton // Mitt. Internat. Verein. Limnol. 1971. N 19.
22. Vollenweider R. A., Talling J. F., Westlake D. F. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. Oxford, 1974.

Т. Н. Покатилова

Лимнологический институт СО РАН

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИРАНОМЕТРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ЭНЕРГИИ ПОДВОДНОЙ СОЛНЕЧНОЙ РАДИАЦИИ

Рассмотрены методы измерения подводной солнечной радиации общего спектра и в области ФАР модифицированным стандартным пиранометром с набором стеклянных светофильтров.

Измерения приходящей на поверхность Земли энергии солнечной радиации общего спектра (300—3000 нм), ведущиеся на метеорологических станциях, производятся стандартным пиранометром системы Ю. Д. Янишевского [9]. Пиранометр имеет почти постоянную чувствительность по спектру и слабую температурную зависимость, что выгодно отличает его от других фотоприемников. Такой прибор был приспособлен и для актинометрических измерений в природных водах, где он регистрирует поток солнечных лучей всех длин волн, поступающих на горизонтальную площадку.

Чтобы получить более высокую чувствительность, необходимую для измерения ослабленного водной средой излучения, у термобатареи подводного пиранометра увеличено число термосплавов. Помещена она в герметический корпус с широким входным окном, закрытым плоским или выпуклым прозрачным стеклом. Обычно применяется органическое стекло, которое, хотя и имеет ряд полос поглощения в длинноволновой области после 1200 нм, хорошо пропускает лучи фиолетовой части спектра начиная с 300 нм. Оно удобно для механической обработки, и из него может быть получено путем нагревания и выдавливания выпуклое покровное стекло необходимой формы. Для каждого типа покровного стекла вводится поправочный множитель к измеренным величинам радиации при переходе из воздуха в воду [2].

Результаты подводных измерений обычно выражают в процентах от приходящей на поверхность воды радиации, а график ее изменения с глубиной строят в полулогарифмическом масштабе. При этом из-за неравномерного ослабления в водной толще спек-

тально сложного потока солнечных лучей получают слабоизогнутую кривую.

Если взять за основу ее среднюю часть, которая близка к прямой, то она может быть принята за экспоненту с постоянным показателем ослабления и описана формулой экспоненциального закона Бугера [9]:

$$I_z/I_0 = B \exp(-\alpha Z), \quad (1)$$

где I_0 — энергия радиации, приходящей на поверхность воды, I_z — энергия на горизонте Z , α — показатель вертикального ослабления в воде энергии радиации, равной B % от радиации на поверхности. Для интегральной по спектру радиации B составляет приблизительно 40—60 %. Величина α зависит в основном от прозрачности и цветности воды. Для прозрачных вод, таких, как в открытом оз. Байкал, установлена эмпирическая связь

$$\alpha = 1,6/Z_s^{0,85}, \quad (2)$$

где Z_s — прозрачность по диску Секки. Для окрашенных вод рек, озер и других небольших водоемов числитель дроби несколько выше — 2,24. При прозрачности меньше 1 м в окрашенных водах влияние взвешенных частиц приводит к уменьшению этого числа.

Возможно также представление хода солнечной радиации с глубиной в виде суммы экспонент [2]:

$$I_z/I_0 = B_0 + \sum_{j=1}^m B_j \exp(-\alpha_j Z), \quad (3)$$

где B_j характеризует часть энергии спектра, которая ослабляется с глубиной по экспоненте с постоянным показателем ослабления α_j , B_0 — процент энергии, поглощенной и рассеянной в слое воды до глубины, с которой начинаются измерения. Для описания кривых достаточно 2—3 экспоненты.

Ход относительных величин солнечной радиации с глубиной можно описывать формулой, используемой И. Л. Пыриной [6]:

$$I_z/I_0 = \exp(-\alpha Z^n), \quad (4)$$

где посредством параметра n компенсируется снижение ослабления радиации по мере ее проникновения в глубь водосма и достигается возможность использования в расчетах постоянной величины α . На водохранилищах Волжского каскада при прозрач-

ности воды от 0,8 до 1,7 м показатель степени n в среднем равен 0,705, а компенсируемая таким образом величина показателя вертикального ослабления $\alpha_n = 2,83/Z_s^{0,4}$. При этом относительные величины энергии на горизонтах рассчитываются с точностью, равной точности измерения пиранометром.

Анализ данных измерений радиации в водах других рек, озер и водохранилищ показал, что при малой прозрачности воды можно применять такое же описание хода радиации с глубиной, хотя разброс показателей n и α_n несколько больше. Установлено также, что при прозрачности воды более 2 м по диску Секки показатель степени n растет с глубиной, находясь примерно в пределах от 0,25 до 0,80, а α_n уменьшается. Весь столб воды от 0,25 м до глубины, где солнечная радиация составляет около 0,5 % приходящей на поверхность воды, при прозрачности воды до 5 м можно разделить на 2 слоя, а при прозрачности более 5 м — на 3 слоя, в которых n и α_n практически постоянны. Такой прием позволяет уточнить расчет относительного количества проникающей солнечной радиации.

Непосредственные измерения показателя вертикального ослабления могут быть проведены с помощью альфаметра, в котором одновременно работают 2 датчика пиранометра, разнесенные по глубине. Такой прибор сконструирован Иркутским филиалом опытного завода СО РАН. Данные одновременных измерений солнечной радиации и пиранометрами интегрируются с помощью электронной схемы, и цифры последовательно выдаются на индикаторе прибора. Время интегрирования можно изменить в несколько раз. Прибор позволяет также получить абсолютные величины энергии радиации на глубинах, причем результаты не зависят от изменения уровня освещенности в течение измерений.

В связи с тем что спектральное пропускание водой излучения различных длин волн неодинаково, с глубиной происходит „срезание” радиации наиболее коротких и длинных волн. При этом в прозрачной воде сильнее других ослабляются длинноволновые лучи, а в мутной — коротковолновые [4].

Ослабление с глубиной монохроматических лучей с длиной волны λ можно считать подчиняющимся закону Бугера [9]:

$$I(Z, \lambda) = I(0, \lambda) \exp(-\alpha_\lambda Z), \quad (5)$$

где $I(0, \lambda)$ — радиация, проникающая под поверхность воды, $I(Z, \lambda)$ — радиация на глубине Z , α_λ — показатель ослабления лучей с длиной волны λ . Величина α_λ зависит от угловой структуры солнечной радиации. Однако этот эффект невелик, поэтому α_λ можно считать „квази-внутренним” свойством воды [10].

Распределение (%) солнечной радиации разных спектральных диапазонов по глубине

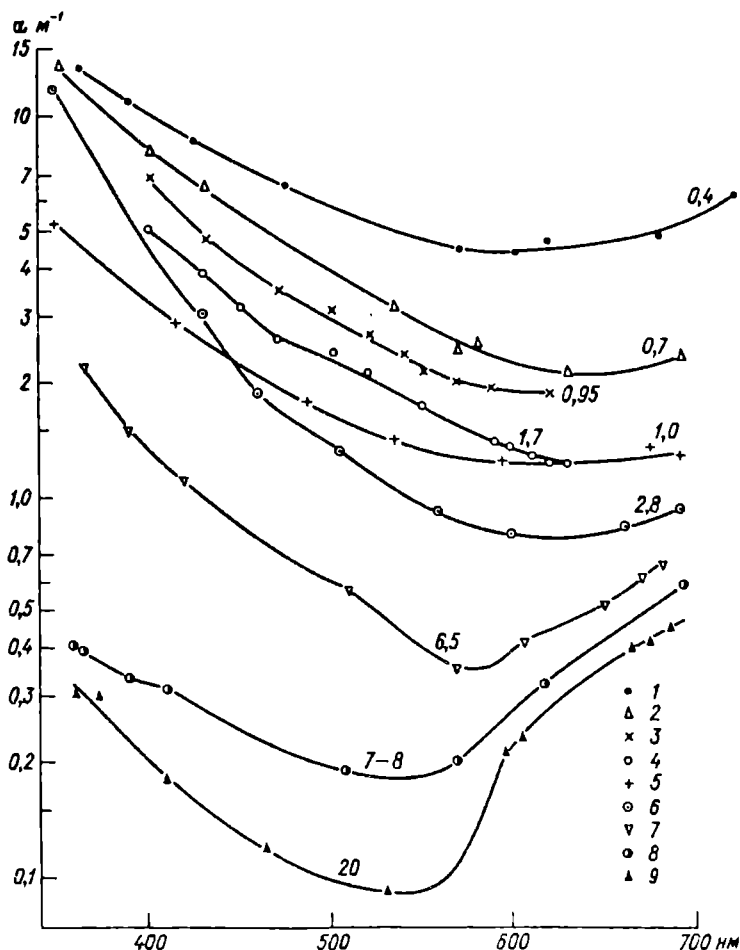
Глубина, м	УФ/УФ ₀	ФАР/ФАР ₀	ИК/ИК ₀	ФАР/И	УФ/И	ИК/И	ФАР/И ₀	I/I ₀	
								расчи- танное	измерен- ное
Шекснинское водохранилище, верхний бьеф, прозрачность 1,7 м									
0,10	43,05	76,96	33,11	67,53	3,22	29,25	36,79	54,47	—
0,25	13,54	56,85	18,23	74,45	1,51	24,04	27,17	36,49	37,6
0,50	2,13	35,80	8,35	80,65	0,41	18,94	17,11	21,22	23,5
0,75	0,36	23,43	4,18	84,67	0,11	15,22	11,20	13,23	13,6
1,00	0,06	15,74	2,20	87,66	0,03	12,31	7,53	8,58	9,4
1,25	0,01	10,77	1,19	89,99	0,01	10,00	5,15	5,72	—
1,50	0,00	7,47	0,66	91,82	0,00	8,18	3,57	3,89	4,25
2,00	0,00	3,70	0,22	94,43	0,00	5,57	1,77	1,87	2,09
2,50	0,00	1,88	0,07	96,14	0,00	3,86	0,90	0,93	1,04
3,00	0,00	0,97	0,03	97,29	0,00	2,71	0,46	0,48	0,73
4,00	0,00	0,26	0,00	98,65	0,00	1,35	0,13	0,13	0,21
5,00	0,00	0,07	0,00	99,33	0,00	0,67	0,04	0,04	0,10
6,00	0,00	0,02	0,00	99,67	0,00	0,33	0,01	0,01	—
8,00	0,00	0,00	0,00	99,92	0,00	0,08	0,00	0,00	—

Южный Байкал, открытая часть, прозрачность 20 м

0,10	92,24	93,70	35,25	68,36	5,74	25,90	44,79	65,51	—
0,25	87,59	91,08	21,45	75,81	6,21	17,98	43,53	57,43	56,5
0,50	80,37	86,93	11,66	82,38	6,49	11,12	41,55	50,43	50,2
0,75	73,76	83,03	6,96	86,20	6,53	7,27	39,69	46,04	—
1,00	67,73	79,36	4,36	88,65	6,45	4,91	37,94	42,79	42,7

1,25	62,20	75,92	2,83	90,31	6,31	3,39	36,29	40,18	—
1,50	57,15	72,67	1,89	91,48	6,14	2,39	34,73	37,97	38,7
2,00	48,29	66,71	0,89	93,01	5,74	1,25	31,89	34,28	35,3
2,50	40,86	61,39	0,44	93,99	5,33	0,68	29,35	31,22	32,7
3,00	34,61	56,63	0,23	94,68	4,93	0,38	27,07	28,59	30,3
4,00	24,92	48,47	0,06	95,68	4,19	0,13	23,17	24,21	25,7
5,00	18,02	41,79	0,02	96,41	3,54	0,04	19,97	20,72	22,9
6,00	13,08	36,24	0,01	97,00	2,98	0,01	17,32	17,86	19,8
8,00	6,97	27,65	0,00	97,90	2,10	0,00	13,22	13,50	15,6
10,00	3,76	21,41	0,00	98,53	1,47	0,00	10,23	10,39	12,1
15,00	0,83	11,76	0,00	99,40	0,60	0,00	5,62	5,65	6,8
20,00	0,19	6,68	0,00	99,75	0,25	0,00	3,19	3,26	3,8
30,00	0,01	2,28	0,00	99,96	0,04	0,00	1,09	1,09	1,2

Примечание. УФ — 300—380 нм, ФАР — 380—700 нм, ИК — 700—3000 нм, I — 300—3000 нм, индекс 0 — над поверхностью воды.



Спектральные распределения показателей вертикального ослабления α в разных водоемах.

1 — р. Селенга у пос. Кабанск, 29.08.87; 2 — р. Енисей близ г. Игарка, у левого берега, 28.06.84; 3 — Шекснинское водохранилище, Сизьменское расширение; 14.08.79, 4 — Шекснинское водохранилище, верхний бьеф, 16.08.79; 5 — р. Енисей у г. Лесосибирск, 21.07.84; 6 — р. Коршуниха, устье, 18.07.85; 7 — Средний Байкал у Ушканьих островов, 13.08.88; 8 — Южный Байкал, у берега, 18.07.86; 9 — Южный Байкал, открытая часть, 5.07.86. Арабские цифры у кривых — прозрачность воды по диску Секки, римские — цветность воды по шкале Фореля — Уля.

На основе спектральных значений α_λ и спектра приходящей на поверхность лучистой энергии солнца $I_0(\lambda)$ можно рассчитать величины солнечной радиации любых участков спектра, проникающей на различные глубины водоема, по формуле

$$I(Z) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} k I_0(\lambda) \exp(-\alpha_\lambda Z) d\lambda, \quad (6)$$

где k — коэффициент пропускания солнечной энергии поверхностью воды, примерно равный 0,955 [3].

Такой расчет проведен с помощью ЭВМ численным методом для диапазонов 300—380, 380—700, 700—3000 и 300—3000 нм на примере резко различных в оптическом отношении вод оз. Байкал и Шекснинского водохранилища (см. таблицу). Для расчетов весь спектр был разделен на участки шириной 20—40 нм, внутри которых α_λ принималось постоянным. Спектральное распределение солнечной радиации над поверхностью воды было взято из работы [1] с учетом данных в области ФАР, полученных для оз. Байкал [7]. Показатели α_λ в диапазоне $\lambda = 370—700$ нм (см. рисунок) получены измерениями пиранометром или селеновым фотоэлементом со светофильтрами [4], а для λ , меньших 370 нм, экстраполированы. Для длин волн больше 700 нм α_λ находили как показатели поглощения чистой водой плюс показатели поглощения и рассеяния растворенным и взвешенным веществом [5]. Близкое сходство рассчитанных для всего спектра (300—3000 нм) данных с измеренными пиранометром свидетельствует о достаточно высокой точности расчета.

Можно измерить энергию в области спектра 380—710 нм, относящуюся к ФАР, используя пиранометр в сочетании со стеклянными светофильтрами БС-8 и КС-19. Для этого необходимо сделать измерения с тем и другим фильтрами и по разности показания определить искомую величину энергии. В случае очень чистой воды можно ограничиться измерениями с одним светофильтром БС-8, а мутной и окрашенной — КС-19, определив затем количество ФАР по разности радиации общего спектра и измеренной под этим фильтром.

Следует заметить, однако, что излучение с длинами волн меньше 380 нм и больше 710 нм ослабляется в водной среде наиболее интенсивно. Поэтому вычленение доли ФАР из проникающей в водоем солнечной радиации не имеет большого смысла. Тем более, что это создает дополнительные трудности при измерениях, а проблема оценки подводной радиации общего солнечного спектра в значительной степени решена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авасте О., Молдау Х., Шифрин К. С. Спектральное распределение прямой и рассеянной радиации // Исследования по физике атмосферы. Тарту, 1962. Вып. 3.
2. Довгий Т. Н. Подводная солнечная радиация на Байкале. Новосибирск, 1977.
3. Оптика океана. М., 1983.
4. Покатилова Т. Н. Спектральное ослабление солнечной радиации в природных водах // Гидрология Байкала и других водоемов. Новосибирск, 1984.
5. Покатилова Т. Н. Способ оценки вкладов рассеяния и поглощения в ослабление с глубиной в водоемах солнечной радиации // Оптика моря и атмосферы. Л., 1988.
6. Пырина И. Л. Об ослаблении солнечной радиации в природных водах // Первая Верещагинская байкальская международная конференция. Тез. докл. Иркутск, 1989.
7. Степанова В. В., Шерстянкин П. П. Спектральное распределение суммарной радиации в видимой части спектра на Байкале // Автоматизация лимнологических исследований и световой режим водоемов. Новосибирск, 1984.
8. Янишевский Ю. Д. Актинометрические приборы и методы наблюдений. Л., 1957.
9. Jerlov N. G. (Ерлов Н. Г.) Оптика моря. Л., 1976.
10. Siegel D. A., Dickey T. D. Observations on the vertical structure of the diffuse attenuation coefficient spectrum // Deep-See Res. 1987. Vol. 34, N 4.

В. В. Бульон

Зоологический институт РАН

ПЕРВИЧНАЯ ПРОДУКЦИЯ И ТРОФИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ВОДОЕМОВ

Обсуждается проблема трофической классификации вод на основании продукционных характеристик фитопланктона. Приведены граничные величины концентраций хлорофилла, первичной продукции на единицу объема воды и площади водоемов различного трофического уровня. Дано математическое описание взаимосвязи между показателями первичной продукции фитопланктона для разного типа водных экосистем.

Для трофической классификации водоемов в начальной стадии ее разработки использовались разные критерии: содержание биогенных элементов, соотношение концентраций растворенного кислорода в эпилимнионе и гипolimнионе, интенсивность аккумуляции CO_2 в гипolimнионе, комплексы видов беспозвоночных и т. д. [11, 14, 17, 18, 20]. Между всеми этими критериями нет прочной связи, поэтому оцениваемые по ним типы озер вырисовывались нечетко, более или менее надежно очерчивались лишь два крайних класса озер — олиготрофные и эвтрофные. Такое положение сохранялось длительное время, хотя „много раз указывалось, что олиготрофный и эвтрофный типы озер представляют собой обобщенную характеристику крайних членов ряда природных объектов” [6, с. 291].

Только количественные исследования интенсивности продукционных процессов, в первую очередь первичной продукции планктона, послужили той „главной осью”, вокруг которой стала строиться современная система типологии водоемов. Приоритет первичной продукции обусловлен тем, что благодаря ей общая биологическая продуктивность (или трофность) водоема получила количественное выражение. В настоящее время термины „первичная продукция” и „трофность” воспринимаются многими гидробиологами как синонимы.

Г. Г. Винберг [6], сопоставив материалы по первичной продукции озер европейской части СССР, выделил среди них четыре основных класса: 1) малопродуктивные олиготрофные и дистроф-

ные озера, 2) мезотрофные, 3) эвтрофные, 4) высокоэвтрофные, или политрофные. Годовые величины первичной продукции, положенные в основу данной классификации, укладываются в относительно узкие границы: от 150 в олиготрофных до 3500 ккал/м² в высокоэвтрофных озерах. Такой спектр величин объясняется тем, что до конца 50-х годов исследования ограничивались преимущественно водоемами умеренных зон.

Система классификации продолжала развиваться по мере поступления новых сведений о водоемах разных регионов и географических широт. Лайкенс [16] привлек для классификации пресных вод, кроме величин первичной продукции, данные по биомассе фитопланктона, содержанию хлорофилла „а” и общего органического углерода. На основании суточных значений интегральной первичной продукции (годовые величины не использованы) он [16] разделил озера на ультраолиготрофные, олиготрофные, мезотрофные, эвтрофные и дистрофные (табл. 1).

Таблица 1

Количественные показатели трофического статуса озер (по [16])

Тип озера	Первичная продукция, мг C/(м ² · сут)	Хлорофилл, мкг/л	Органический углерод, мг/л	Биомасса фитопланктона, мкг C/л
Ультраолиготрофный	< 50	0,01—0,5	—	< 50
Олиготрофный	50—300	0,3—3	1—3	20—100
Мезотрофный	250—1000	2—15	1—5	100—300
Эвтрофный	600—8000	10—500	5—30	> 300
Дистрофный	50—500	0,1—10	3—25	50—200

Система градации озер северных и умеренных зон детально разработана С. П. Китаевым [9]. В частности, по годовым величинам первичной продукции ($\Sigma \Sigma A$) им выделено семь категорий вод. При общем размахе от 125 до 4000 ккал/м² граничные значения $\Sigma \Sigma A$ для каждой категории составляют геометрическую прогрессию со знаменателем, равным 2: α -олиготрофные — менее 125 ккал/м², β -олиготрофные — 125—250, α - и β -мезотрофные — соответственно 250—500 и 500—1000, α - и β -эвтрофные — 1000—2000 и 2000—4000, гиперэвтрофные — более 4000 ккал/м².

В работах В. И. Абросова [1—3] проблема типологии озер рассматривается в неразрывной связи с типами лимногенеза. Для озер гумидной зоны выделено пять стадий развития: олиготрофии, мезотрофии (или эвтрофикации), эвтрофии, дистрофикации и дистрофии. На стадиях эвтрофикации и дистрофикации, т. е. на

подъеме и спаде трофности, озера имеют, очевидно, сходные уровни первичной продукции. Поэтому можно говорить о 1-й и 2-й мезотрофии. Генетическая классификация озер заслуживает серьезного и специального обсуждения. Отметим только, что градация озер по величинам первичной продукции должна рассматриваться в дальнейшем в контексте развития водных экосистем во времени, как это уже было предпринято в начале века (шкала Тинемана—Наумана), но с учетом накопленных данных региональной биолимнологии.

Годовые величины первичной продукции представляют наибольший интерес для лимнологической и рыбохозяйственной типологии водоемов. Годовую первичную продукцию фитопланктона можно рассматривать как функцию ее суточных величин (ΣA) и длительности вегетационного сезона (T):

$$\Sigma \Sigma A = k (\Sigma A)_{\max} T,$$

где (ΣA) — максимальная за вегетационный сезон суточная величина первичной продукции в целом столбе воды, k — коэффициент, показывающий отношение площади под кривой сезонного хода ΣA к площади прямоугольника со сторонами (ΣA)_{max} и T .

Аргумент (T) играет важную роль в формировании урожая фитопланктона. При одних и тех же значениях ΣA в разгар вегетации водорослей годовая первичная продукция озер умеренных широт выше, чем более северных, и ниже, чем более южных. Кроме того, вегетационный сезон фитопланктона в крупных по площади и глубинам озерах длится дольше, чем в мелких, благодаря более медленному охлаждению водных масс в осенне-зимний период и раннему цветению весной. Поэтому крупные озера, олиготрофные по содержанию хлорофилла „а” в планктоне, скорости фотосинтеза на оптимальной глубине и под единицей площади за сутки, могут быть мезотрофными по годовым величинам первичной продукции. Таким примером служит оз. Тахо в США [13], где, по данным радиоуглеродного метода, интегральная первичная продукция за сутки составляет в среднем 150 мг С/м² (признак олиготрофии), за год — около 500 ккал/м² (признак мезотрофии).

Так как длительность вегетационного сезона и многие факторы внешней среды, определяющие продукционные возможности фитопланктона, связаны с широтой поясностью, наибольшие величины годовой продукции фитопланктона могут быть найдены только в тропической зоне — 12—14 тыс. ккал/м² в озерах и до 30 тыс. ккал/м² в удобряемых рыбоводных прудах [12, 19].

Минимальные величины, до $1-5 \text{ ккал/м}^2$, обнаруживаются в условиях высокой Арктики и Антарктики [5, 8].

Как показывает практика гидробиологических исследований, в умеренных широтах первичная продукция фитопланктона возрастает от 100 до $3500 \text{ ккал/(м}^2 \cdot \text{год)}$ в направлении от олиготрофных к эвтрофным водоемам, а граничные ее значения для олиготрофного, мезотрофного и эвтрофного класса вод составляют геометрическую прогрессию со знаменателем, равным 3—3,5. Сохраняя этот принцип подразделения и учитывая данные последних лет для водоемов, расположенных за пределами умеренной зоны, т. е. до 10 и 81° с. ш. , можно выделить восемь категорий природных вод (табл. 2).

Таблица 2

Трофическая классификация озер по годовым величинам
первичной продукции

Тип озер	$\Sigma \Sigma A \text{ ккал/(м}^2 \cdot \text{год)}$
Суперэвтрофные (гиперэвтрофные тро- пические)	свыше 10000
Гиперэвтрофные	3500—10000
Эвтрофные	1000—3500
Мезотрофные	300—1000
Олиготрофные	
умеренных широт	100—300
тундр и Субарктики	30—100
Арктики	10—30
высокой Арктики	менее 10

Вероятно, верхняя ступень трофической шкалы заканчивается группой суперэвтрофных водоемов с первичной продукцией до 30 тыс. $\text{ккал/(м}^2 \cdot \text{год)}$, выше которой трудно представить ее величину, учитывая эффект соматотенения клеток фитопланктона в сильно цветущих водах. В пределах умеренных широт продуктивность фитопланктона вряд ли бывает ниже $100 \text{ ккал/(м}^2 \cdot \text{год)}$, даже если принимать во внимание дистрофные озера [10], но в Арктике такая величина первичной продукции характерна для относительно продуктивных озер [15].

Оценка трофического статуса водоемов по годовым величинам первичной продукции планктона требует регулярных наблюдений на протяжении вегетационного сезона, что в ряде случаев технически невыполнимо. Поэтому следует уделять внимание величинам суточной продукции фитопланктона в единице объема воды при оптимальных световых условиях ($A_{\text{опт}}$) и под единицей площади (ΣA), измеряемым в середине лета. При этом под $A_{\text{опт}}$ подразумевается скорость фотосинтеза на глубине с опти-

мальными световыми условиями. В таком понимании A_{opt} отличается от A_{max} , показателя фотосинтеза при насыщающей интенсивности света. Величина A_{opt} нередко меньше A_{max} , они равны только при световом насыщении фотосинтеза. Классификация водоемов по величинам A_{opt} и ΣA разработана преимущественно на примере европейских озер с большим относительным содержанием растительного планктона и планктоногенного материала в сестоне. В таких „планктонных” озерах концентрационные и интегральные показатели первичной продукции согласуются между собой исходно в силу того, что классификация разрабатывалась на их основе. Более того, продукционные характеристики фитопланктона и оптические свойства воды, определяющие глубину фотической зоны, в какой-то мере взаимообусловлены, так как одним из главных факторов, контролирующих уровень первичной продукции в столбе воды, выступает самозатенение фотосинтезирующих организмов.

В природе нередко случаи значительного отклонения от „планктонного” типа озер. Так, в крупных по площади, но мелководных озерах, отличающихся большой открытостью для ветрового перемешивания, прозрачность воды и, следовательно, глубина фотической зоны определяются не концентрацией планктона и планктоногенного сестона, сколько содержанием в воде взмученных иловых частиц (детрита). Примером таких „детритных” озер могут служить многие озера Монголии и сопредельных районов Забайкалья [5]. Озера „детритного” типа по интегральным величинам первичной продукции менее продуктивны, чем озера „планктонного” типа, несмотря на их сходство по концентрациям хлорофилла „а” в планктоне и скоростям фотосинтеза на оптимальной глубине.

Для разработки трофической классификации, учитывающей особенности как „планктонных”, так и „детритных” озер, важно правильно выбрать основополагающий критерий трофности. Как показывает практика, при нерегулярных наблюдениях содержание хлорофилла „а” в планктоне ($C_{хл}$) точнее отражает трофический статус озер, чем скорость фотосинтеза, легко реагирующая на изменения погодных условий. Иными словами, содержание хлорофилла „а” — более консервативный показатель трофности и поэтому при соблюдении определенных условий полнее передает продукционный потенциал фитопланктона. По Г. Г. Винбергу [6] и И. С. Захаренкову [7], в олиготрофных водах летние концентрации хлорофилла „а” составляют от 0,1 до 1 мкг/л, в мезотрофных — от 1 до 10, в эвтрофных — от 10 до 100, в гиперэвтрофных — более 100 мкг/л. Предложенная градация условна, но тем не менее она удобна, так как граничные значения $C_{хл}$

для каждого класса вод выражаются в виде степени с основанием, равным 10.

Для того чтобы преобразовать систему подразделения вод по содержанию хлорофилла в систему характерных для каждого их типа величинам первичной продукции, следует произвести анализ связей между концентрацией хлорофилла „а”, скоростью фотосинтеза на глубине оптимального освещения, интегральной первичной продукцией под 1 м² и прозрачностью воды. Ниже приводятся уравнения, отражающие средние соотношения между этими показателями. Уравнения построены на основании материалов, собранных в водоемах с разным уровнем трофности и расположенных в различных регионах [5]. Связь между скоростью фотосинтеза при оптимальном освещении и содержанием хлорофилла „а” в озерах планктонного и детритного типов можно выразить общим уравнением

$$A_{\text{опт}} = 31 C_{\text{хл}}^{0,914} \approx 30 C_{\text{хл}}, \quad (1)$$

где $A_{\text{опт}}$ — интенсивность фотосинтеза (мкг С/(л · сут)), $C_{\text{хл}}$ — концентрация хлорофилла (мкг/л). Подставляя в уравнение (1) наиболее распространенные в природе значения $C_{\text{хл}}$ (от 0,1 до 100 мкг/л), находим, что в направлении от олиготрофных к эвтрофным озерам значения $A_{\text{опт}}$ увеличиваются в среднем от 3 до 3000 мкг С/(л · сут) (табл. 3).

Таблица 3

Содержание хлорофилла „а” ($C_{\text{хл}}$), скорость фотосинтеза при оптимальной освещенности ($A_{\text{опт}}$), относительная прозрачность воды (S) и первичная продукция под единицей площади (ΣA) в „планктонных” и „детритных” озерах разной трофности

ИТС	$C_{\text{хл}}$ мкг/л	$A_{\text{опт}}$ мкг С/(л · сут)	S м		ΣA мкг С/(м ² · сут)	
			„Планктонные” озера	„Детритные” озера	„Планктонные” озера	„Детритные” озера
0	0,01	—	—	—	—	—
20	0,1	3	16	13	50	40
40	1	30	6	3,2	180	100
60	10	300	2	0,75	600	230
80	100	3000	0,75	0,18	2300	550
100	1000	—	—	—	—	—

Примечание. ИТС — индекс трофического статуса: от 0 до 20 — ультра-олиготрофные, от 20 до 40 — олиготрофные, от 40 до 60 — мезотрофные, от 60 до 80 — эвтрофные, от 80 до 100 — гиперэвтрофные озера.

Следует подчеркнуть, что „планктонные” и „детритные” озера представляют собой два крайних типа экосистемы, различающихся по структуре трофической сети. Для первого типа экосистем более вероятен поток энергии, направленный по пастбищной цепи, для второго типа — по детритной цепи с непременно́м участием гетеротрофных микроорганизмов. Однако большинство экосистем относится к смешанному типу, так как пастбищная и детритная цепи в них тесно взаимосвязаны.

В озерах, близких к планктонному типу, зависимость относительной прозрачности воды по диску Секки от биомассы фитопланктона, измеренной в единицах массы хлорофилла „а”, аппроксимируется уравнением

$$S = 5,7 C_{\text{хл}}^{-0,44}, \quad (2)$$

где S — прозрачность воды (м), $C_{\text{хл}}$ — концентрация хлорофилла (мкг/л).

В озерах детритного типа, которые по структуре трофической сети находятся как бы на противоположном полюсе по отношению к „планктонным” озерам, связь между S и $C_{\text{хл}}$ имеет форму, отличную от (2):

$$S = 3,2 C_{\text{хл}}^{-0,62}. \quad (3)$$

Величины параметров в уравнениях (2) и (3) подтверждают, что при одной и той же концентрации хлорофилла „а” прозрачность воды в „детритных” озерах значительно ниже, чем в „планктонных”. Подставляя в эти уравнения разные значения аргумента (от 0,1 до 100 мкг/л), находим, что с повышением уровня трофности прозрачность воды в экосистемах планктонного типа снижается в среднем от 16 до 0,75 м, в экосистемах детритного типа — в среднем от 13 до 0,18 м (табл. 3). Как показано на рис. 1, линии регрессии S по $C_{\text{хл}}$ для двух крайних типов озер сходятся при высоких значениях прозрачности и малых количествах фитопланктона, характерных для глубоких водоемов с небольшим относительным содержанием аллохтонного и суспензированного из илов материала. Регрессии расходятся с возрастанием $C_{\text{хл}}$ и с уменьшением S , что сопутствует, как правило, снижению средней глубины водоемов.

Рассмотренные здесь закономерные связи между светопропускаемостью воды и концентрацией фотосинтетических организмов

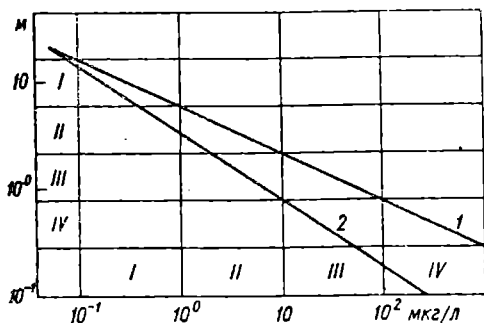


Рис. 1. Соотношение между относительной прозрачностью воды (м) и содержанием хлорофилла „а“ в планктоне (мкг/л) в озерах планктонного (1) и детритного (2) типов. Линии регрессии соответствуют уравнениям (2) и (3).

I — зона олиготрофных, II — мезотрофных, III — эвтрофных, IV — гиперэвтрофных озер.

помогают выявить этап, с которого начинается принципиальное расхождение интегральных продукционных характеристик фитопланктона в „планктонных“ и „детритных“ озерах. Интегральная первичная продукция в столбе воды, являясь функцией прозрачности воды и скорости фотосинтеза на глубине оптимальных световых условий [4, 21], в первом приближении может быть оценена по уравнению

$$\Sigma A = A_{\text{опт}} S, \quad (4)$$

где ΣA — первичная продукция в мг С/(м² · сут), $A_{\text{опт}}$ — интенсивность фотосинтеза (мкг С/(л · сут)), S — прозрачность воды (м).

Позже было показано [5], что данная зависимость несколько отличается от линейной функции, но для удобства в настоящих построениях используется первоначальное, более простое, ее выражение. Уравнение (4) применимо к водоемам разной трофности, с любым сочетанием количества живого и детритного растительного материала в сестоне. Однако надо принять во внимание, что при равных величинах $A_{\text{опт}}$ значения S в озерах двух крайних типов оказываются разными (табл. 3). Это неизбежным образом отражается на характере изменения величины ΣA с ростом уровня трофности, оцениваемого по концентрации хлорофилла „а“ и скорости фотосинтеза на оптимальной по условиям освещения глубине.

Интегральная первичная продукция возрастает в направлении от олиготрофных вод к эвтрофным в экосистемах планктонного типа от 50 до 2300 мг С/(м² · сут) (табл. 3). К такому же заключению можно прийти чисто расчетным путем. Комбинируя уравнения (2) и (3) с (1), находим:

$$S' = 26 A_{\text{opt}}^{-0,44}, \quad (5)$$

$$S'' = 26 A_{\text{opt}}^{-0,62}.$$

Комбинируя (5) и (6) с (4), приходим к выводу, что

$$\Sigma A' = 26 A_{\text{opt}}^{0,56}, \quad (7)$$

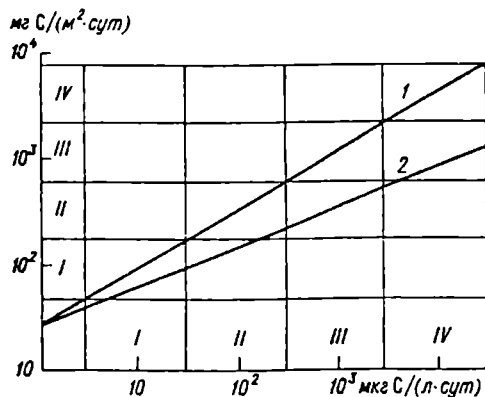
$$\Sigma A'' = 26 A_{\text{opt}}^{0,38},$$

где S' и S'' , $\Sigma A'$ и $\Sigma A''$ — относительная прозрачность воды и первичная продукция под единицей площади соответственно в „планктонных” и „детритных” озерах.

Расположение каждого конкретного водоема относительно линий регрессии, описываемых уравнениями (7) и (8) и иллюстрирующих взаимосвязь между величинами интегральных и концентрационных показателей первичной продукции в разнотипных водах (рис. 2), зависит от соотношения концентраций растительного

Рис. 2. Соотношение величин скорости фотосинтеза на глубине оптимальных световых условий ($\text{мкг С}/(\text{л} \cdot \text{сут})$) и первичной продукции в столбе воды ($\text{мг С}/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$) в озерах планктонного (1) и детритного (2) типов.

Линии регрессий соответствуют уравнениям (7) и (8). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.



планктона и детрита, автохтонных и аллохтонных веществ и от окрашенности воды растворенными веществами. Чем сильнее воздействуют на светопроницаемость воды ее окрашенность и детритный материал, тем ближе объект исследования к нижней прямой. Поэтому, например, среди водоемов, относимых по A_{opt} к мезотрофному типу, могут быть как мезотрофные, так и олиготрофные, если в качестве критерия трофности использовать ΣA .

Такая же ситуация складывается и в других классах вод, что усложняет оценку трофического статуса тех объектов, которые в силу своих региональных особенностей существенно отличаются от „планктонных” озер, послуживших основой традиционной классификации.

Рассмотренные зависимости между отдельными показателями первичной продукции планктона находятся пока еще на стадии разработки. Параметры всех вышеприведенных уравнений и количественные оценки уровней трофности водоемов носят ориентировочный характер и в дальнейшем могут быть уточнены. Тем не менее анализ их взаимосвязи весьма полезен для понимания основных принципов классификации водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абросов В. Н. Некоторые проблемы типологии озер // Круговорот вещества и энергии в озерных водоемах. М., 1967.
2. Абросов В. Н. Зональность большого и геологического круговорота вещества и энергии в озерах // Круговорот вещества и энергии в озерных водоемах. Новосибирск, 1975.
3. Абросов В. Н. Зональные типы лимногенеза. Л., 1982.
4. Бульон В. В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л., 1983.
5. Бульон В. В. Закономерности первичной продукции в лимнических экосистемах. Л., 1992.
6. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
7. Захаренков И. С. Содержание хлорофилла в планктоне как биологический показатель при классификации озер // Биология внутренних водоемов Прибалтики. М.; Л., 1962.
8. Кауп Э. Б. Динамика основных экологических факторов и первичной продукции в водоемах оазиса Ширмахера (Земля королевы Мод, Антарктида): Автореф. дис...канд. биол. наук. Тарту, 1981.
9. Китаев С. П. Экологические основы биопродуктивности озер разных природных зон. М., 1984.
10. Романенко В. И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л., 1985.
11. Elster H. J. Das limnologische Seetypensystem. Rückblick und Ausblick // Verh. Int. Vereln. Limnol. 1958. Bd 13, Pt 1.
12. Ganapati S. V., Sreenivasan A. Energy flow in aquatic ecosystems in India // Productivity problems of freshwaters. Warszawa; Krakow, 1972.
13. Goldman C. R., Amezaga E. Spatial and temporal changes in the primary productivity of Lake Tahoe, California, Nevada, between 1959—1971 // Verh. Int. Vereln. Limnol. 1975. Bd. 19, Pt 2.
14. Hutchinson G. E. A treatise on limnology. Vol. 1. Geography, physics and chemistry. London, 1957.
15. Kalff J., Welch H. E. Phytoplankton production in Char Lake, a natural polar lake, and in Meretta Lake, a polluted polar lake, Cornwallis Island, Northwest Territories // J. Fish. Res. Board Canada. 1974. Vol. 31, N 5.
16. Likens G. E. Primary production of inland aquatic ecosystems // Primary productivity of the biosphere. Berlin; Heidelberg; New York, 1975.
17. Naumann E. Grundzüge der regionalen Limnologie // Die Binnengewässer. Stuttgart, 1932. Bd 11.
18. Ohle W. Bioactivity, production, and energy utilization of lakes // Limnol., Oceanogr. 1956. Vol. 1, N 3.

19. Sreenivasan A. Energy transformations through primary productivity and fish production in some tropical freshwater impoundments and ponds // Productivity problems of freshwaters. Warszawa; Krakow, 1972.

20. Thienemann A. Der Sauerstoff im eutrophen und oligotrophen See // Die Binnengewässer. Stuttgart, 1928. Bd 4.

21. Vollenweider R. A. Sichttiefe und Produktion // Verh. Int. Verein. Limnol. 1958. Bd 13 Pt 1.

И. С. Трифонова

*Институт озерадения РАН***ОЦЕНКА ТРОФИЧЕСКОГО СТАТУСА ВОДОЕМОВ
ПО СОДЕРЖАНИЮ ХЛОРОФИЛЛА „А” В ПЛАНКТОНЕ**

Обсуждается проблема оценки уровня трофии водоема по концентрациям хлорофилла. Приведены индексы трофического состояния вод, полученные разными авторами на основании данных о содержании этого пигмента.

Определение содержания хлорофилла получило широкое распространение как экспресс-метод оценки уровня развития фитопланктона. Особое значение эти работы приобрели в связи с проблемой эвтрофирования, поскольку уровень содержания хлорофилла в водоеме отражает его трофический статус. Они были начаты еще в 50-х годах под руководством Г. Г. Винберга [3, 4, 10], но более интенсивно развивались зарубежными исследователями. Г. Г. Винберг [4] пришел к выводу, что предельные концентрации хлорофилла в природных водах составляют от 0,1 до 500 мкг/л. Теоретически им было оценено максимально возможное количество хлорофилла в эвфотной зоне водоемов, составляющее 750 мг/м². Позднее Стиман-Нильсен [40] на культурах водорослей показал, что эта величина достигает 800 мг/м² для суспензии зеленых (хлорелла) и 480 мг/м² — для диатомовых.

Все данные, полученные на водоемах разных широт за последние 30 лет, практически укладываются в указанные пределы. В большинстве умеренно продуктивных водоемов содержание хлорофилла „а” составляет до 35 мкг/л, а в среднем за вегетационный сезон — до 10 мкг/л [19, 20, 25, 41, 46]. Минимальные концентрации пигмента (0,1—1,0 мг/м³) характерны для арктических, горных и других олиготрофных озер [1, 8, 11, 16, 46]. Максимальные величины (100—200 мг/м³) получены в высокоэвтрофных водоемах [12, 19, 25, 27, 38]. Более высокие величины отмечены лишь в удобряемых прудах, а также в некоторых южных водохранилищах. Так, для защищенных участков Кременчугского водохранилища на Днепре приводится содержание хло-

рофилла, равное 700 мг/м^3 [13], хотя в значительной степени оно было связано с концентрированием фитопланктона за счет нагонных явлений. В содовых озерах Эфиопии с массовым развитием *Spirulina platensis* концентрации хлорофилла достигали 1 г/м^3 [42].

Г. Г. Винберг, проанализировав большой фактический материал по белорусским озерам, впервые предложил простую шкалу трофности водоемов по содержанию хлорофилла [4]. Позднее эта шкала дополнялась и уточнялась на основании других исследований водоемов нашей страны [1, 14, 15, 17, 19]. Некоторые из таких шкал, составленные учеными разных стран, приведены в табл. 1. Наиболее приемлемой можно считать шкалу, которая разработана в рамках международной программы мониторинга внутренних вод по заданию ОЕСД (Organization for Economic Cooperation and Development) и основана на данных для наибольшего числа водоемов мира.

Таблица 1

Шкалы для оценки трофности водоемов по содержанию хлорофилла „а“ (мкг/л)

Трофическое состояние					Источник
ультра-олиго-трофное	олиго-трофное	мезо-трофное	эвтрофное	гиперэв-трофное	
—	< 1	1—10	10—100	> 100	[4]
—	0,1—7,6	1,6—14,0	3,8—53,0	73—224	[10]*
0,01—0,5	0,3—3,0	2—15	10—500	—	[47]
—	< 1,8	1,8—4,3	4,3—40	—	
					P. Z. Brezonik, E. E. Shannon, no [5]
—	< 3	3—8	8—20	> 20	[15]
—	< 1,5	1,5—10	10—50	> 50	[19]
—	0,3—4,5	3,0—11	2,7—78,0	100—150	[45]
—	< 4	8—16	16—32	> 32	[14]
≤ 1,0	≤ 2,5	2,5—8,0	8—25	≥ 25	[35]
—	0,1—1,0	1,0—10	> 10	> 100	[1]*

* На основании летних концентраций.

При оценке трофического статуса водоема по содержанию хлорофилла необходимо учитывать его сезонную динамику. Большинство исследователей отмечают, что в целом сезонная динамика хлорофилла хорошо отражает изменение биомассы фитопланктона, хотя пики того и другого показателей не всегда совпадают [7, 19]. Отсутствие полного совпадения обусловлено зна-

чительными колебаниями процентного содержания хлорофилла в сырой биомассе водорослей, которое меняется в широких пределах в зависимости от их видовой принадлежности и физиологического состояния, световых условий, содержания биогенных веществ. Эта величина в течение года может изменяться на порядок [6, 24, 34, 43].

В ультраолиготрофных водоемах, таких, как оз. Хубсугул и оз. Верхнее, сезонная динамика хлорофилла выражена слабо [11, 46]. В олиготрофных озерах отмечается один весенний пик подо льдом или сразу после вскрытия. Например, это имеет место в оз. Охотничье [21] и в оз. Байкал в урожайные годы [11]. В мезотрофных озерах и водохранилищах наблюдаются два или три пика содержания хлорофилла в течение года. Такой тип сезонной динамики характерен для оз. Нарочь в Белоруссии [25] и многих мезотрофных озер Карельского перешейка [21], Рыбинского и Братского водохранилищ [7, 11]. В слабоэвтрофных водоемах в сезонной динамике хлорофилла прослеживаются три и более пиков, из которых летний выделяется особенно высокими концентрациями пигмента. Преобладание летнего пика хлорофилла с максимальным его содержанием, как правило, в августе характерно и для высокоэвтрофных водоемов, таких, как белорусское оз. Баторино и оз. Вишневское на Карельском перешейке [19, 25]. Совсем иная картина наблюдается в гипертрофных водоемах, где динамика фитопланктона обычно носит хаотический характер. После периодов очень высокой биомассы, которые могут быть весной или осенью, наступает массовая гибель водорослей и, как результат, — стадия „чистой воды”. При этом пики биомассы могут отмечаться в таких водоемах подо льдом, особенно в озерах с преобладанием видов рода *Oscillatoria* [23].

В целом, несмотря на значительную сезонную вариабельность, среднее за год или вегетационный период содержание хлорофилла в стабильных экосистемах достаточно постоянно и может быть надежным показателем трофического статуса водоема. Максимальные величины, по нашим данным, как правило, превышают средние в 2-4 раза, а по обобщенным для водоемов мира — в 1,6 раза [45]. При отсутствии режимных наблюдений для мониторинга большого количества водоемов можно использовать данные за наиболее показательные периоды годового цикла, прежде всего за период летней стагнации.

В конце 60-х гг. была выявлена решающая роль биогенной нагрузки в эвтрофировании водоемов и установлена прямая корреляция между содержанием хлорофилла и общего фосфора [44]. Это позволило более точно оценивать трофический статус водоема и прогнозировать процесс эвтрофирования на ранних стадиях [29, 36, 45]. Был получен целый ряд зависимостей, описанных математически, между концентрацией общего фосфора и содержанием хлорофилла „а” в планктоне для различных водоемов

мира. Часть из них, преимущественно для озер умеренной зоны, приведены в табл. 2.

Таблица 2

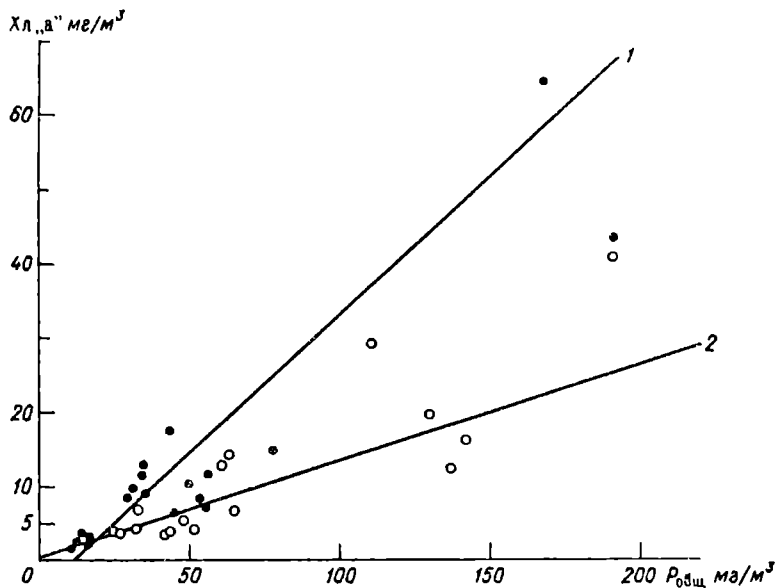
Зависимость содержания хлорофилла „а“ в планктоне разных водоемов от концентраций общего фосфора

Район исследования	Уравнение регрессии	Источник
Япония	$\lg X_{\text{л}} = 1,583 \lg P_{\text{общ}} - 1,134$	[36]
Англия	$\lg X_{\text{л}} = 0,871 \lg P_{\text{общ}} + 0,48^*$	[33]
США	$\lg X_{\text{л}} = 1,45 \lg P_{\text{общ}} - 1,14$	[29]
Озера мира (по МБП)	$X_{\text{л}} = 0,46 \lg P_{\text{общ}} - 3,87$	[37]
Озера мира (143 озера)	$\lg X_{\text{л}} = 1,46 \lg P_{\text{общ}} - 1,09$	[31]
Карельский перешеек	$\lg X_{\text{л}} = 1,270 \lg P_{\text{общ}} - 1,113$	[18]
Эстония	$\lg X_{\text{л}} = 1,408 \lg P_{\text{общ}} - 1,380$	[14]
Польша	$\lg X_{\text{л}} = 1,49 \lg P_{\text{общ}} - 1,32$	[48]
Белоруссия	$\lg X_{\text{л}} = 1,88 \lg P_{\text{общ}} - 1,55$	[9]
Нидерланды	$X_{\text{л}} = 74,5 + 0,19 P_{\text{общ}}^*$	[30]
Латвия	$X_{\text{л}} = 0,575 + 0,205 P_{\text{общ}}$	[23]

* $X_{\text{л}}$ — для весеннего максимума, $P_{\text{общ}}$ — для подледного максимума.

Уравнения регрессии, полученные для озер разной трофности (см. табл. 2), достаточно близки и различаются в основном величинами угловых коэффициентов. Так, для менее продуктивных озер Карельского перешейка линия регрессии проходит выше, чем для эвтрофных озер Латгалии (см. рисунок). Канадские ученые предложили выражать отклик хлорофилла на концентрацию общего фосфора отношением $X_{\text{л}} : P_{\text{общ}}$ [32]. Это отношение варьирует в различных водоемах от 0,01 до 2,8, составляя в большинстве случаев 0,24—0,29 (Nern et al., 1981, цит. по [5]), но чаще оно ниже 0,6. Например, по данным Голтермана [30], в 18 озерах Голландии оно колеблется от 0,25 до 0,73, в среднем составляя 0,49. Изменчивость отношения $X_{\text{л}} : P$ отмечается как в различных озерах, так и в одном озере по сезонам, что, по мнению автора, частично связано с сукцессией доминирующих видов водорослей, а отчасти объясняется методическими ошибками при определении ортофосфатов. По-видимому, обеспеченность азотом также существенно изменяет реакцию фитопланктона на увеличение концентрации фосфора, и соотношение между этими элементами ($N : P$) может быть основной причиной вариабельности отношения $X_{\text{л}} : P$ [39]. Этот вопрос несомненно требует дальнейших исследований.

В связи с этим очевидно, что за основу оценки трофического состояния водоема следует принимать содержание хлорофилла, т. е. реализованную продукцию, а не потенциальную, соответст-



Зависимость концентраций хлорофилла от среднего содержания общего фосфора.

1 — Карельский перешеек, 2 — Латгальская возвышенность.

вующую содержанию общего фосфора, но не достигаемую во многих водоемах из-за лимитирования другими факторами [5]. Как правило, степень трофности водоема, оцениваемая по хлорофиллу, оказывается менее высокой, чем при использовании в качестве ее критерия содержания общего фосфора.

При оценке трофии водоемов становится очевидным, что ее уровни в действительности представляют собой лишь стадии между олиготрофным и эвтрофным состояниями в непрерывной цепи трофических превращений. Одно и то же озеро по одним показателям может быть эвтрофным, а по другим — сохранять черты мезотрофии и даже олиготрофии. Недостаточность номенклатурной системы традиционного деления водоемов на олиготрофные, мезотрофные и эвтрофные не может компенсироваться введением дополнительных промежуточных типов, усложняющих типизацию. Нецелесообразна также и разработка многопараметровых индексов, требующих определения многих показателей.

Для целей экологического мониторинга наиболее перспективны показатели трофии, основанные на взаимосвязи нескольких параметров и позволяющие по одному из них оценить трофический тип водоема. Так, на основании тесной зависимости между

содержанием хлорофилла, общего фосфора и прозрачностью воды Карлсоном [28] разработана шкала индексов трофического состояния (ИТС) водоемов, позволяющая оценивать статус водоема по одному из перечисленных показателей. В качестве основного параметра используется прозрачность воды по белому диску (S), каждое удвоение которой увеличивает индекс на 10. В качестве исходной взята прозрачность 64 м, при которой ИТС = 0. Исходя из зависимости $\ln S = 2,04 - 0,68 \ln X_{\text{л}}$, был получен индекс трофического состояния по хлорофиллу, который равняется нулю при концентрации хлорофилла 0,04 мг/л (табл. 3). В нумерической шкале Карлсона [28] индексы изменяются от 0 до 100. Озера с ИТС ниже 30 относятся к олиготрофным, от 30 до 60 — к мезотрофным и выше 60 — к эвтрофным. Каждое увеличение индекса на 10 по Карлсону соответствует удвоению биомассы фитопланктона. Индекс трофического состояния по хлорофиллу считается наиболее надежным показателем, так как он не зависит от содержания взвесей неводорослевого происхождения.

Таблица 3

Индексы трофического состояния водоемов по хлорофиллу (ИТС)

ИТС	Источник
$\text{ИТС}_{\text{хл}} = 10 \left(6 - \frac{2,04 - 0,68 \lg X_{\text{л}}}{\lg 2} \right)$	[28]
$\text{ИТС}_{\text{хл}} = 24,6 + 25,1 \lg$	[26]
$\text{ИТС}_{\text{хл}} = 20,0 + 33,2 \lg X_{\text{л}}$	Цит. по [5]
$\text{ИТС}_{\text{хл}} = 40 + 20 \lg X_{\text{л}}$	[2]

Позднее индексы Карлсона были усовершенствованы другими исследователями [2, 26], но за основу во всех случаях брали содержание хлорофилла (табл. 3). Эти индексы нашли широкое применение в лимнологии, в частности индекс Уолкера (цит. по [5]), использованный при определении трофического состояния малых озер Эстонии [14]. В. В. Бульоном [2] предложена более простая шкала, в которой ИТС увеличивается на 20 единиц при возрастании концентраций хлорофилла в 10 раз. Индексы ниже 20 характеризуют ультраолиготрофное состояние, от 20 до 40 — олиготрофное, от 40 до 60 — мезотрофное, от 60 до 80 — эвтрофное и выше 80 — гиперэвтрофное.

Однако признавая значение различных индексов для определения трофического статуса водоемов, Г. Г. Винберг [5] предостерегал от чрезмерного увлечения ими. При их усложнении или усреднении в значительной степени теряется информация об индивидуальных особенностях водоемов. В связи с этим нумерическая шкала, которая может быть построена непосредственно по величинам содержания хлорофилла [2, 22], представляет особенно большой интерес.

1. Бульон В. В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л., 1983.
2. Бульон В. В. Первичная продукция планктона и классификация озер // Продукционно-гидробиологические исследования водных экосистем. Л., 1987.
3. Винберг Г. Г. Содержание хлорофилла как показатель количественного развития фитопланктона // Третья экол. конф.: Тез. докл. Киев, 1954. Ч. 4.
4. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов. Минск, 1960.
5. Винберг Г. Г. Сравнительно-биологические исследования, их возможности и ограничения // Тр. ГосНИОРХ. 1986. Вып. 252.
6. Елизарова В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в единице биомассы фитопланктона Рыбинского водохранилища // Флора, фауна и микроорганизмы Волги. Рыбинск, 1974.
7. Елизарова В. А. Сезонная динамика и распределение пигментов фитопланктона в Рыбинском водохранилище // Биология и систематика низших организмов. Л., 1978.
8. Елизарова В. А., Пырина И. Л., Гецен М. В. Содержание пигментов фитопланктона Харьейских озер // Продуктивность озер восточной части Большеземельской тундры. Л., 1976.
9. Жукова Т. В., Ковалевская Р. З. Связь фосфор-хлорофилл „а“ в озерах разной трофности // Антропогенное эвтрофирование природных вод. Черноголовка, 1983.
10. Захаренков И. С. Содержание хлорофилла в планктоне озер разных типов // Первичная продукция морей и внутренних вод. Минск, 1961.
11. Измествеева Л. Р. Содержание хлорофилла „а“ в водоемах Байкальского региона: Автореф. дис...канд. биол. наук. Киев, 1983.
12. Ковалевская Р. З. Первичная продукция оз. Дривяты // Биологическая продуктивность эвтрофного озера. М., 1970.
13. Курейшев А. В. Изменение содержания хлорофилла в фитопланктоне в период интенсивного „цветения“ воды синезелеными водорослями // Гидробиол. журн. 1979. Т. 15, № 1.
14. Милиус А. Ю. Определение трофического состояния малых фитопланктонных озер при помощи индекса трофии по хлорофиллу „а“ в фитопланктоне // Изв. АН ЭССР. Т. 32, № 2.
15. Милиус А. Ю., Кываск В. О. О количественных показателях фитопланктона как индикаторах трофности // Изучение и освоение водоемов Прибалтики и Белоруссии. Рига, 1979.
16. Пырина И. Л., Елизарова В. А., Николев И. И. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне Онежского озера и их значение для оценки уровня продуктивности этого водоема // Микробиология и первичная продукция Онежского озера. Л., 1973.
17. Пырина И. Л., Елизарова В. А. Сравнительная характеристика водоемов различного трофического уровня по содержанию хлорофилла // Круговорот веществ и биологическое самоочищение водоемов. Киев, 1980.
18. Стравинская Е. А., Трифонова И. С., Ульянова Д. С. Соотношение концентрации фосфора и хлорофилла „а“ в разнотипных озерах Карельского перешейка // Круговорот вещества и энергии в водоемах. Иркутск, 1981. Вып. 5.
19. Трифонова И. С. Состав и продуктивность фитопланктона разнотипных озер Карельского перешейка. Л., 1979.
20. Трифонова И. С. Содержание хлорофилла и феопигментов в фитопланктоне Ладожского озера в 1975—1976 гг. // Биология внутренних вод. Информ. бюл. Л., 1981. № 49.
21. Трифонова И. С. Фитопланктон и его роль в продукции органического вещества // Особенности формирования качества воды в разнотипных озерах Карельского перешейка. Л., 1984.

22. Трифонова И. С. Определение трофического статуса озер двух озерных районов Северо-Запада СССР по первичной продукции, содержанию хлорофилла и трофическим индексам // Тр. ГосНИОРХ. 1989. Вып. 252.
23. Трифонова И. С. Содержание хлорофилла и скорость продуцирования органического вещества фитопланктоном в озерах с разным уровнем концентраций биогенных элементов // Трансформация органического и биогенных веществ при антропогенном эвтрофировании озер. Л., 1989.
24. Трифонова И. С., Дезортова Б. Хлорофилл как мера биомассы фитопланктона в водоемах разного типа // Гидробиологические процессы в водоемах. Л., 1983.
25. Экологическая система Нарочанских озер. Минск, 1985.
26. Alzaki M., Otsuki A., Fukushima T. et al. Application of Carlson's trophic state index to Japanese lakes and relationships between the index and other parameters // Verh. Int. Verein. Limnol. 1981. Vol. 21, Pt. 1.
27. Bindloss M. Primary productivity of phytoplankton in Loch Leven, Kinross // Proc. Roy. Soc. Edinburgh. 1974. Vol. 74, N 1.
28. Carlson R. E. A trophic state index for lakes // Limnol., Oceanogr. 1977. Vol. 22, N 2.
29. Dillon P. J., Rigler F. H. The phosphorus-chlorophyll relationship in lakes // Limnol., Oceanogr. 1974. Vol. 19, N 5.
30. Golterman H. L. Chlorophyll-phosphate relationships, a tool for water management // Algae and the aquatic environment. Bristol, 1988.
31. Jones J. R., Bachman R. W. Prediction of phosphorus and chlorophyll levels in lakes // J. Water Pollut. Contr. Fed. 1976. Vol. 48, N 9.
32. Kalff J., Knoechel R. Phytoplankton and their dynamic in oligotrophic and eutrophic lakes // Ann. Rev. Ecol. Syst. 1978. N 9.
33. Lund J. W. G. Primary production // Water Treatment and Examination. 1970. Vol. 19.
34. Nichols K. H., Dillon P. J. An evaluation of phosphorus-chlorophyll-phytoplankton relationships for lakes // Int. Rev. gesamt. Hydrobiol. 1978. Bd 63, H. 2.
35. OECD. Eutrophication of waters. Monitoring, assessment and control. Paris, 1982.
36. Sakamoto M. Primary production by phytoplankton community in some Japanese lakes and its dependens on lake depth // Arch. Hydrobiol. 1966. Bd 62, H. 1.
37. Schindler D. W. Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters // Limnol., Oceanogr. 1978. Vol. 23, N 3.
38. Schindler D. W., Comita G. W. The dependence of primary production upon physical and chemical factors in a small, senescing lake, including the effect of complete winter oxygen depletion // Arch. Hydrobiol. 1972. Bd 69, H. 4.
39. Smith V. H. The nitrogen and phosphorus dependence of algal biomass in lakes: an empirical and theoretical analysis // Limnol. Oceanogr. 1982. Vol. 27, N 6.
40. Steemann-Nielsen E. On the maximum quantity of plankton chlorophyll per surface unit of a lake or the Sea // Int. Rev. Ges. Hydrobiol. 1962. Bd 47, H. 3.
41. Talling J. F. Comparative problems of phytoplankton production and photosynthetic productivity in a tropical and a temperate lake // Primary Production in aquatic environments. Pallanza. 1965.
42. Talling J. F., Wood R. B., Prosser M. V., Baxter E. M. The upper limit of photosynthetic productivity by phytoplankton: evidence from Ethiopian lakes // Freshwater. Biol. 1973. Vol. 3, N 1.
43. Tolstoy A. Chlorophyll "a" as a measure of phytoplankton biomass // Acta Univ. Upsal. 1977. Vol. 416.
44. Vollenweider R. A. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication // OECD technical report. Paris, 1968.

45. Vollenweider R. A., Kerekes J. The loading concept as basis for controlling eutrophication philosophy and preliminary results of the OECD programme on eutrophication // *Progr. Water. Technol.* 1980. Vol. 12, Pt. 2.
46. Vollenweider R. A., Munawar M., Stadelmann P. A comparative review of phytoplankton and primary production in the Laurentian Great Lakes // *J. Fish. Res. Board Canada*. 1974. Vol. 31, N 5.
47. Wetzel R. G. *Limnology*. Philadelphia, 1975.
48. Zdanowski B. Variability of nitrogen and phosphorus contents and lake eutrophication // *Pol. Arch. Hydrobiol.* 1983. Vol. 29, N 3.

Предисловие	3
О. М. Кожова. Стратегия изучения первичной продукции как начального звена продукционного процесса в водоеме	4
И. Л. Пырина. Кислородный метод определения первичной продукции фитопланктона	10
В. В. Бульон. Радиоуглеродный метод определения первичной продукции фитопланктона, его возможности и ограничения в сравнении с кислородным методом	14
И. Л. Пырина. Особенности условий для фотосинтеза в изолированных пробах фитопланктона	21
В. М. Гольд, В. А. Попельницкий. Определение фотосинтеза фитопланктона флуоресцентным методом	25
И. Л. Пырина, М. М. Сметанин. Расчет интегральных и средних величин первичной продукции и оценка их точности	30
В. В. Бульон. Внеклеточная продукция фитопланктона и ее потребление гетеротрофными микроорганизмами	41
В. И. Шербак. Определение первичной продукции отдельных видов водорослей автордиографическим методом	47
В. А. Елизарова. Опыт определения продукции фитопланктеров альгологическим методом	52
Ю. М. Лебедев. Балансовый метод и определение первичной продукции в водотоках	59
В. М. Гольд, Н. М. Минеева, З. Г. Гольд, И. М. Попельницкая. Дыхание фитопланктона: проблемы и методы	66
Л. Е. Сигарева. Спектрофотометрический метод определения пигментов фитопланктона в смешанном экстракте	75
Г. А. Корнюшенко. Хроматографический метод и возможности его использования для изучения пигментов фитопланктона	86
А. Д. Апонасенко, <u>Ф. Я. Сидько</u> , В. А. Васильев. Определение концентраций хлорофилла фитопланктона по дифференциальным спектрам поглощения света	97
Н. А. Гаевский, И. Ю. Шатров, В. М. Гольд. Флуоресцентный анализ пигментов фитопланктона	101
А. А. Гительсон. Дистанционное измерение концентраций хлорофилла "а" по спектрам диффузного рассеянного водой излучения	110
Д. В. Поздняков. Определение концентрации хлорофилла фитопланктона по данным дистанционного лазерного зондирования	114
Л. Е. Сигарева. Пигментная модель фитопланктона и ее использование	120
В. А. Елизарова. Хлорофилл как показатель биомассы фитопланктона	126
И. Л. Пырина. Определение подводной фотосинтетически активной радиации	132
Т. Н. Покатилова. Использование пиранометра для измерения энергии подводной солнечной радиации	139
В. В. Бульон. Первичная продукция и трофическая классификация водоемов	147
И. С. Трифонова. Оценка трофического статуса водоемов по содержанию хлорофилла "а" в планктоне	158

**Методические вопросы
изучения первичной продукции
планктона внутренних водоемов**

Редактор О. Э. Александрова

Н/К

Подписано в печать 17. 08. 93. Формат 60 × 84/16. Бумага офсетная.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 9,77. Усл. кр.-отт. 10,0. Уч.-изд. л. 11,07.
Тираж 1000 экз. Индекс ГЛ-68. Заказ. **779** Заказное.
Гидрометеонадат, 199327, Санкт-Петербург, В. О., ул. Беринга, д. 38.
ФООП, 249020, Обнинск, ул. Королева, д. 6.