

Министерство рыбного хозяйства РСФСР      Академия наук СССР  
Государственный                                      Зоологический институт  
научно-исследовательский институт  
озерного и речного рыбного хозяйства  
(ГосНИОРХ)

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО СБОРУ И ОБРАБОТКЕ МАТЕРИАЛОВ  
ПРИ ГИДРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ  
НА ПРЭСНОВОДНЫХ ВОДОЕМАХ.  
БАКТЕРИОПЛАНКТОН И ЕГО ПРОДУКЦИЯ

Научные редакторы

чл.-кор. АН СССР Г.Г.Винберг,  
канд.бисл. наук Г.М.Лаврентьева

Составители

А.П.Романова,  
М.В.Фурсенко

Редактор Ю.А.Барулин  
Корректор С.Я.Торгашина

© Государственный научно-исследовательский институт  
озерного и речного рыбного хозяйства (ГосНИОРХ),

1984



## БАКТЕРИИ

Роль микроорганизмов в водоеме чрезвычайно многогранна, она отражает все сложнейшие связи между абиотической средой и гидробионтами, а также связи последних между собой. Функциональное значение бактерий в водоеме двояко: в процессе синтеза и круговорота веществ оно сводится к минерализации органики, т.е. бактерии являются последним звеном продукционного процесса — редуцентами; в трофической цепи бактерии выступают в качестве первого звена, так как потребляются "мирной" гидрофауной.

Для оценки уровня развития бактериальной флоры и ее функциональной активности необходимо определить следующие важные показатели: численность —  $N$ , биомассу —  $B$ , величину бактериальной продукции —  $P_0$ , оборачиваемость бактериальной массы —  $P/B$ , интенсивность дыхания —  $R$ , количество ассимилированного бактериями органического вещества —  $A = (P + R)$  и коэффициент эффективности использования ассимилированной энергии —  $K_2$ .

### I. Сбор бактериопланктона

I.1. Выбор станций и частота взятия проб. Процесс обработки проб бактериопланктона сопряжен с большой затратой времени. Поэтому объем материала должен быть ограничен в такой степени, чтобы при минимальном числе проб получить достаточно репрезентативные результаты. Необходимое количество станций на акватории водоема, число точек по вертикальной оси и режим взятия проб должны быть определены в строгом соответствии с конкретными задачами гидробиологических исследований.

I.1.1. Для оценки уровня развития бактерий при однократном обследовании водоемов (типа рыбохозяйственного кадастра) рекомендуется устанавливать максимально возможное количество станций. Сетка точек взятия проб составляется на основе батиметрической карты. Число станций на каждом биотопе должно быть пропорционально его доле в общем объеме водоема. Для характеристики вертикального распределения бактериопланктона пробы отбираются у поверхности, на глубине удвоенной прозрачности (стык трофического и трофолитического слоев) и у дна.

1.1.2. При проведении на озерах и водохранилищах биопродукционных исследований, для которых требуется постановка сезонных или многолетних наблюдений, сбор проб должен производиться на постоянных станциях или стандартных разрезах в целях сопоставления результатов во временном аспекте. Станции устанавливаются в наиболее характерных и значимых для водоема биотопах.

В водохранилищах станции устанавливаются в зонах с различным гидрологическим режимом: речной, переходной и озеровидной. В зонах водохранилищ, характеризующихся высоким водообменом, пробы следует отбирать только из поверхностного и придонного горизонтов, учитывая относительную однородность среды. В озеровидной части пробы берутся из поверхностного горизонта, с глубины удвоенной прозрачности (обычно зона максимального скопления бактерий) и придонного горизонта. Съёмки, как правило, выполняются один раз в основные сезоны: весной (май), летом (июль-август) и осенью (сентябрь-октябрь).

На озерах для учета сезонных изменений численности и биомассы бактериопланктона устанавливается не менее двух станций в пелагиали и две-три - в прибрежье. При этом в каждом биотопе закрепляется одна постоянная станция для определения функциональных показателей бактериопланктона.

1.1.3. При проведении комплексных биопродукционных исследований число точек отбора проб по вертикали определяется общей глубиной водоема и величиной прозрачности. Пробы бактериопланктона берутся на тех же горизонтах, что и пробы фитопланктона: у поверхности, на середине слоя прозрачности, на глубине прозрачности, удвоенной глубине прозрачности, в середине нижележащего слоя и у дна. При необходимости взятие пробы может производиться только из середины эпи-, мета- и гипolimниона.

В менее глубоководных гомотермных озерах для оценки запаса бактериопланктона целесообразно пользоваться интегрированной пробой, смешанной из нескольких проб (4-7), отобранных по всему столбу воды.

1.1.4. Сбор проб и постановка опытов на водоеме при проведении сезонных исследований обычно производится в открытый период - с мая по октябрь и в подледный - в январе и марте. Режим взятия проб следующий: не реже одного раза в месяц зимой и в периоды весенней и осенней гомотермии, и еженедельно летом, когда

в условиях максимального прогрева водоема развитие гидробионтов протекает наиболее интенсивно.

I.1.5. При проведении наблюдений за развитием бактериопланктона под воздействием какого-либо направленного фактора, например сброса теплых вод ГРЭС, нет необходимости брать всю сетку стандартных станций, обычно устанавливаемых при рейсовых обследованиях водохранилищ. Достаточно наметить определенный участок для проведения локальных работ и установить одну контрольную (вне зоны влияния теплых вод) и 3-4 станции по ходу распространения теплых вод - обычно на протяжении 12-15 км от места сброса вниз по течению. Отбор проб по вертикали производится у поверхности, у нижней границы слоя прогрева и у дна. Режимные наблюдения необходимо усилить в летний период, при максимальном прогреве водоема. Пробы следует отбирать не менее одного раза в месяц.

I.1.6. В результате проведения на малых озерах целого ряда интенсификационных мероприятий, направленных на обогащение кормовой базы для рыб (внесение дополнительных биогенов, использование искусственных кормов), в них создаются условия, резко отличающиеся от водоемов с естественным режимом. В этом случае необходимо осуществлять систематический микробиологический контроль за водоемом. Основным условием проведения наблюдений должна быть максимальная частота взятия проб при минимально возможном количестве станций. Наблюдения рекомендуется проводить следующим образом. В прибрежной и глубоководной частях озера устанавливаются две постоянные станции. При наличии в районе исследований однотипного неудобряемого озера в нем закрепляются также две станции в качестве контрольных для оценки воздействия проводимых интенсификационных мероприятий на микрофлору.

При оценке интенсивности процессов синтеза бактериального белка пробы для анализа рекомендуется брать с нескольких горизонтов: при глубине водоема до 5 м - из поверхностного и придонного горизонтов; в водоемах глубиной до 10 м и неустойчивым температурным режимом - у верхней и нижней границ трофического слоя, из середины трофолитического слоя и у дна.

Для контроля за анаэробными процессами разрушения органического вещества следует ограничиться отбором проб из придонно-

го горизонта.

Частота сбора проб для разных анализов различна. Определение общей численности бактериопланктона и группы гнилостных бактерий проводят непосредственно до внесения удобрений и через 1, 3, 6, 12, 24 суток после внесения. При двух-трехразовом внесении удобрений, обычно в июне-июле, отсчет возобновляется после внесения новой порции удобрений. В августе-сентябре и вплоть до облозов (как правило, в октябре) эти анализы можно проводить один раз в конце месяца. Для оценки процессов сульфатредукции и денитрификации пробы достаточно отбирать раз в месяц в июне и июле и 2-3 раза в месяц к концу вегетационного периода - в августе-октябре.

1.2. Приборы для отбора проб воды. При проведении микробиологических исследований отбор проб воды и грунта, как правило, производится с соблюдением условий стерильности. Это требование обязательно при отборе проб для выявления бактерий отдельных физиологических групп.

Для стерильного отбора проб рекомендуется скляночный батометр со сменной стерильной бутылкой объемом 0,25-0,5 л, наиболее подробно описанный А.Г.Рединой.

При отборе проб воды для учета общей численности бактерий наряду со скляночным батометром могут быть использованы металлические приборы, например батометры Рутнера, Паталаса.

При постановке опытов по определению скорости размножения бактериопланктона для отбора проб рекомендуется пользоваться батометрами со свободным током воды, которые в большей мере, чем скляночный, обеспечивают отлов планктонных животных.

При применении металлических батометров их внутренние поверхности обрабатывают горячим ватным тампоном, смоченным спиртом, либо промывают в водоеме путем многократного протягивания в открытом виде.

## 2. Определение и расчет численности и биомассы бактерий

2.1. Определение общей численности бактерий позволяет учесть массу микроорганизмов, которые осуществляют процесс деструкции

органического вещества. Общая численность бактериопланктона учитывается методом ультрафильтрации по А.С.Разумову.

Отобранные для анализа пробы не обязательно отфильтровывать в полевых условиях. Пробу можно зафиксировать 40%-ным формалином из расчета 0,5-1,0 мл на 100-мл воды и транспортировать в лабораторию для дальнейшей обработки. Объем пробы можно сократить до 15-20 мл, использовав пенициллиновые скля. ки. Соответственно количество формалина уменьшается до 0,1-0,2 мл. Для фильтрации используются мембранные фильтры № 1 и 2 отечественного производства с диаметром пор 0,35 и 0,50 мкм или фильтры - 8, 7, 6 фирмы "Сынпор" ЧССР с диаметром пор 0,23, 0,30 и 0,40 мкм. Из склянки отбирают пипеткой 5-10 мл пробы и фильтруют через мембранный фильтр, помещенный в воронку Зейтца, закрепленную в колбе Бунзена. Существует много других разновидностей приборов для ультрафильтрации. После отфильтровывания всего объема воды ультрафильтр подсушивают на фильтровальной бумаге под стеклянным колпаком, либо в высокой чашке Петри. При подготовке препарата из естественной незафиксированной пробы фильтр следует подсушивать в парах формалина. На полях фильтра шариковой ручкой проставляют порядковый номер и год. В дневнике расшифровывают запись.

Фильтры окрашивают 3-5%-ным раствором эритрозина в течение 4-24 час и затем отмывают от краски путем перекалывания их на влажную фильтровальную бумагу до получения слабо-розового отпечатка на ней. Фильтры не следует отмывать до полного исчезновения окраски отпечатка, так как это может привести к обесцвечиванию бактериальных клеток.

Для подсчета микроорганизмов часть фильтра (1/2-1/4) помещается на предметное стекло и микроскопируется под иммерсией. Рекомендуется просчитывать 20 полей зрения. В этом случае вероятная ошибка средней составляет  $\pm 8,2\%$ .

Расчет численности бактерий производится по формуле

$$N = \frac{K \cdot n}{V},$$

где  $N$  - число бактерий в 1 мл воды (млн.кл.);  $K = \frac{S}{s}$  - общий для всех расчетов коэффициент - отношение всей фильтрующей

щей площади фильтра  $S$  к площади  $s$ , на которой просчитываются клетки (обе величины в  $\text{мкм}^2$ );  $n$  - среднее число бактерий в одном поле зрения;  $V$  - объем профильтрованной воды (мл).

**Пример расчета.** Радиус фильтрующей поверхности мембранного фильтра равен 13 мм, тогда его площадь  $S = \pi r^2 = 3,14 \times 13000^2 \text{ мкм} = 530,66 \times 10^6 \text{ мкм}^2$ . При увеличении микроскопа в 1440 раз (окуляр 10х, объектив 90х, насадка 1,6х) площадь одного квадрата сетчатого окулярного микрометра равна 10  $\text{мкм}^2$ . При просчете 16 квадратов окулярной сетки просчитываемая в каждом поле зрения площадь составит 1600  $\text{мкм}^2$ . Отсюда  $K = \frac{S}{s} = 331662$ . При отфильтровывании 5 мл пробы среднее число бактериальных клеток равнялось 22 в одном поле зрения (при просчете 20 полей зрения). Численность бактериопланктона  $N = 331662 \frac{22}{5} = 1,66 \text{ млн. кл./мл}$ .

2.2. При подсчете бактерий на мембранных фильтрах одновременно производят измерение их клеток. Для этого во втором окуляре постоянно находится окулярная линейка, что позволяет рассчитать объемы клеток, характерные для того или иного периода исследований и определенного биотопа водоема. При расчете объема клеток они приравниваются к подобным им геометрическим фигурам. Для клеток палочковидной формы применяется формула объема цилиндра  $V = \frac{1}{4} \pi d^2 h$ . Удобно составить таблицу объемов клеток, в которую выписываются ряды из наиболее часто встречающихся сочетаний длины ( $h$ ) и поперечника ( $d$ ) клеток цилиндрической формы и рассчитывается соответствующий им объем ( $V$ ). Результаты записываются в таблицу:

$h$	$d$	$V$
2,2	0,40	0,15
1,2	0,45	0,19
...	...	...

В дальнейшем достаточно найти в таблице линейные размеры клеток, полученные при просмотре конкретного препарата, чтобы получить соответствующий им объем (в  $\text{мкм}^3$ ).

Для определения среднего объема микробных клеток рекомендуется на каждом просчитываемом препарате производить ранжировку наиболее массовых клеток на крупные, средние и мелкие. До-

статочно промерить по 10 клеток каждой размерной группы, чтобы затем на основании их процентного соотношения вывести средний объем клеток.

Измерение бактериальных клеток на окрашенных мембранных фильтрах в последнее время является практически общепринятым способом. При обработке фильтров неизбежно происходит деформация клеток: их объем уменьшается в 1,2-3,0 раза в зависимости от размера и возраста. В связи с этим предлагается вводить в окончательный результат поправку. Рекомендуется применять коэффициент "усыхания" 1,6, предложенный Локк и широко используемый для пересчета объема клеток бактериального сообщества при анализе проб, отобранных в любой сезон года.

2.3. Согласно принятой в настоящее время методике, биомасса бактерий определяется как произведение численности в единице объема, среднего объема бактериальных клеток и удельного веса бактерий, который обычно принимается равным 1. Расчет биомассы производится по формуле

$$B = NV,$$

где  $B$  - биомасса (мг/л);  $N$  - численность (млн. кл./мл);  
 $V$  - средний объем клетки (мкм<sup>3</sup>).

В практику микробиологических исследований последних лет, как упоминалось, прочно вошел метод измерения параметров клеток на окрашенных и неоднократно высушенных ультрафильтрах. Объем "сухих" клеток при помощи коэффициента "усыхания" (чаще всего 1,6) переводится в объем сырых клеток. Сырая биомасса переводится в эквивалентные единицы сухого вещества из расчета, что масса сухого вещества составляет 20% от сырого.

Для сопоставления с показателями развития других гидробионтов биомасса бактериопланктона, рассчитанная в миллиграммах сырой массы на литр, приводится в граммах на кубический метр (г/м<sup>3</sup>).

Пробы бактериопланктона собираются синхронно со сборами фитопланктона и постановкой опытов по определению первичной продукции и деструкции органического вещества. Соблюдается тот же принцип выбора точек взятия проб по вертикали: поверхность, середина прозрачности, прозрачность, удвоенная прозрачность,

середина слоя ото дна до удвоенной прозрачности, придонный горизонт. Для каждого указанного горизонта, с учетом толщины слоя воды, характеризующегося показателями данного горизонта, рассчитывается биомасса бактериопланктона ( $\text{г/м}^3$ ). Сумма полученных таким образом величин дает биомассу бактериопланктона под квадратным метром ( $\text{г/м}^2$ ). Средневзвешенную по столбу воды получаем путем деления этого показателя на общую глубину станции.

Расчет средневзвешенной биомассы по станциям или для озера в целом ведется по формуле:

$$\bar{B} = \frac{B_1 h_1 + B_2 h_2 + \dots + B_n h_n}{h_1 + h_2 + \dots + h_n},$$

где  $B_1 \dots B_n$  — биомасса, характеризующая горизонт;  $h_1 \dots h_n$  — толщина слоя.

Для оценки бактериальной биомассы в водоеме в среднем ( $\text{г/м}^3$ ) следует средневзвешенную биомассу по отдельным станциям ( $\text{г/м}^3$ ) умножить на удельный вес биотопа (в процентах), сложить полученные показатели и затем разделить на 100. При необходимости перевода указанной величины в граммы под квадратным метром ( $\text{г/м}^2$ ) она умножается на среднюю глубину водоема. Один грамм сырого вещества бактерий равен 4,19 кДж; 1 г сухого вещества — 21 кДж. В одном грамме сырого вещества бактерий содержится 0,1 г углерода.

### 3. Определение и расчет продукции бактериопланктона

3.1. Трофическую роль бактериопланктона в водоеме оценивают по скорости размножения бактерий — этот показатель используется для расчета величины бактериальной продукции. Наиболее широкое применение нашел "прямой" метод определения интенсивности размножения бактерий по М.В.Иванову. Метод основан на учете изменений численности (биомассы) бактерий за определенный период в двух изолированных пробах воды, в одной из которых бактерии размножаются в условиях отсутствия зоопланктона, а в другой одновременно происходит как размножение бактерий, так и выедание их зоопланктоном. Зоопланктон из пробы удаляется

фильтрованием ее через стеклянную воронку с двухслойным газом № 49-70, свернутым по форме воронки, либо через воронку Зейтца с фильтром № 6 ("предварительным"). В опыте используются склянки с притертыми пробками объемом от 100 до 250 мл. Из опытных склянок с отфильтрованной и естественной водой берут 5 или 10 мл воды для определения исходного количества бактерий. Склянки инкубируют в водоеме на том горизонте, где были отобраны пробы. В водоемах Северо-Запада экспозиция проб составляет 12 или 24 часа. Такая длительность экспозиции может применяться и для слабоэвтрофных водоемов более южных районов страны. В эвтрофных южных водоемах она не должна превышать 8 час. Исходное и конечное число бактерий в инкубированных склянках устанавливается описанным выше методом ультрафильтрации.

Время удвоения численности бактерий рассчитывается по формуле Стефенсон:

$$g = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg B_t - \lg B_0},$$

где  $g$  - время удвоения численности бактерий (в часах);  
 $t$  - длительность экспозиции (в часах);  $B_0$  - начальная концентрация бактерий в фильтрованной воде (млн.кл./мл);  $B_t$  - конечная концентрация бактерий в той же пробе.

3.2. При определении скорости размножения бактериопланктона обычно рассчитывают время удвоения численности бактерий и затем отождествляют эту величину со временем удвоения их биомассы, допуская, что увеличение биомассы происходит пропорционально нарастанию численности. Однако наряду с делением части клеток происходит, как правило, заметное увеличение размеров всех клеток, что отражается на величине биомассы бактерий к концу экспозиции. Поэтому для получения достоверных величин бактериальной массы необходимо учитывать не только численность, но и биомассу бактерий после суточного опыта. Для этого измеряется объем клеток до и после постановки опыта. Расчет суточного прироста бактериальной массы в целом рекомендуется производить по времени, необходимому для удвоения биомассы популяции, по только что приведенной формуле. В этом случае  $B_0$  и  $B_t$  - биомасса бактерий, определенная на основе численности и объема бактериальных клеток, измеренных в пробе фильтрованной воды в начале и конце опыта.

3.3. Наиболее простой и одновременно обладающий достаточной точностью способ расчета продукции бактерий – по скорости их размножения по Д.Э.Гак. Определение скорости размножения бактериопланктона производится по уравнению  $P_t = \bar{B}Kt$ , где  $\bar{B}$  – средняя биомасса бактерий;  $K$  – константа роста;  $t$  – время экспозиции.

Средняя биомасса бактерий ( $\bar{B}$ ) определяется по начальной ( $B_0$ ) и конечной ( $B_t$ ) концентрации бактерий за время  $t$  в нефильтрованных пробах воды или непосредственно в водоеме (в начале и в конце постановки опыта). Расчет константы скорости роста можно вести двумя путями: либо определить время генерации бактерий, либо непосредственно константу скорости роста  $K$ .

Скорость генерации ( $g$ ) определяется по упоминавшейся общепринятой формуле:

$$g = \frac{t \cdot \lg 2}{\lg B_t - \lg B_0}.$$

Зная время генерации бактерий, можно рассчитать константу скорости роста  $K$  по формуле:

$$K = \frac{\ln 2}{g} = \frac{0,693}{g} \text{ час}^{-1}, \text{ или } \frac{16,63}{g} \text{ сутки}^{-1}.$$

Константа скорости роста может быть определена и непосредственно по начальной ( $B_0$ ) и конечной ( $B_t$ ) концентрации бактерий в фильтрованной воде:

$$K = \frac{\ln B_t - \ln B_0}{t} = \frac{2,303 (\lg B_t - \lg B_0)}{t}.$$

Расчет бактериальной продукции можно также произвести по уравнению:

$$P_t = B_t - B_0 + G,$$

где  $B_0$  и  $B_t$  – соответственно начальная и конечная биомасса бактерий в нефильтрованной пробе;  $G$  – биомасса бактерий, потребленных зоопланктоном за время  $t$ , определяемая по формуле, предложенной А.П.Романовой и А.Н.Эзовым:

$$G = \frac{B_0 \cdot e^{\ln 2 \cdot \frac{t}{g}} - B_t}{\frac{g}{\ln 2} (e^{\ln 2 \cdot \frac{t}{g}} - 1)}$$

#### 4. Определение бактериальной деструкции

4.1. Для оценки роли бактериопланктона в деструкции органического вещества в водоеме следует определить интенсивность дыхания бактериального сообщества ( $R$ ). Проба воды делится на две части: одна отфильтровывается от фито- и зоопланктона через мембранный фильтр № 6 ("предварительный") и помещается в темные кислородные склянки; другая, нефильТРованная, разливается в такие же склянки для определения суммарного потребления кислорода планктоном. Склянки помещают в водоем и экспонируют в течение суток. В начале и в конце опыта во всех склянках учитывается общая численность бактерий и рассчитывается их средняя величина за время опыта в фильтрованной ( $N$ ) и нефильТРованной ( $N'$ ) воде. По разности содержания кислорода в фильтрованной воде в конце и в начале опыта определяют количество кислорода ( $R_t$ ), потребленное бактериопланктоном за время  $t$ . На основании этих величин рассчитывается потребление кислорода одной бактериальной клеткой за единицу времени по уравнению

$$Q = \frac{R_t}{N \cdot t}.$$

Средняя численность бактерий за время опыта рассчитывается по формуле

$$\bar{N} = \frac{N_t - N_0}{\ln N_t - \ln N_0} = \frac{N_t - N_0}{2,303 \cdot \lg \frac{N_t}{N_0}}, \quad (1)$$

где  $N_0$  и  $N_t$  - начальная и конечная численность бактерий в фильтрованной воде;  $R_t$  - количество кислорода, потребленное бактериями в фильтрованной воде за время  $t$ .

Отсюда потребление кислорода одной бактериальной клеткой за час составит:

$$Q = \frac{R_t \cdot 2,303 \lg \frac{N_t}{N_0}}{(N_t - N_0) \cdot t}. \quad (2)$$

Это известная формула Бьюкенена и Фульмера.

При малом различии между  $N_0$  и  $N_t$  формула принимает более простой вид:

$$\bar{N} = \frac{N_0 + N_t}{2} \quad (1') \quad \text{и} \quad Q = \frac{R_t \cdot 2}{(N_0 + N_t) \cdot t}. \quad (2')$$

4.2. Потребление кислорода всей бактериальной популяцией в склянках с естественной водой -  $R'_t$  рассчитывается так же, либо по упрощенной формуле:

$$R'_t = \frac{N'_0 + N'_t}{2} \cdot Q \cdot t, \quad (3)$$

где  $N'_0$  и  $N'_t$  - начальная и конечная численность бактерий в нефильтрованной пробе, либо, при сильно различающихся  $N'_0$  и  $N'_t$ , используется более сложная формула:

$$R'_t = \frac{(N'_t - N'_0)}{2,303 \cdot \lg \frac{N'_t}{N'_0}} \cdot Q \cdot t. \quad (4)$$

## 5. Определение коэффициента $K_2$ бактериопланктона

5.1. На создание биомассы бактерий идет только часть энергии ассимилированной пищи, другая ее часть рассеивается в процессе дыхания. Соотношение трат энергии, идущей на рост и дыхание, показывает эффективность использования ассимилированной пищи на рост или эффективность роста ( $K_2$ ).

Коэффициент  $K_2$  рассчитывается по формулам:

$$K_2 = \frac{P}{P + R}; \quad (1)$$

$$K_2 = \frac{P/B}{P/B + R/B}, \quad (2)$$

где  $P$  - продукция;  $R$  - траты на обмен (дыхание);  $B$  - биомасса. Величины  $P$  и  $R$  должны быть выражены в одинаковых единицах, обычно в единицах энергии, отнесенных к единице времени. В тех же энергетических единицах выражают и  $B$ .

Для определения  $K_2$  бактериопланктона в водоеме пробу воды делят на две порции. Одна из них служит для определения времени удвоения биомассы (см. стр. II), зная которое, можно рассчитать продукцию бактериальной биомассы (см. стр. I2) или  $P/B$  - коэффициент. Другая порция воды используется для измерения дыхания бактерий (см. стр. I3).

Зная скорость потребления кислорода одной клеткой, массу

клетки, энергосодержание единицы массы (калорийность), получаем возможность рассчитать траты на обмен ( $R$ ) или удельные траты на обмен ( $R/V$ ) и выразить их в тех же единицах, что и  $P$  и  $P/V$ . Величины  $R$  и  $R/V$  рассчитывают по формулам:

$$R = \tau \cdot 3,38 \text{ кал/кл.сутки}; \quad R/V = \frac{\tau \cdot 3,38}{\bar{W}} \cdot \text{сутки}^{-1},$$

где  $\tau$  - потребление кислорода (мг  $O_2$ /кл.сутки); 3,38 - оксикалорийный коэффициент (кал/мг  $O_2$ );  $\bar{W}$  - среднее энергосодержание одной бактериальной клетки (кал/кл). Обычно принимают, что энергосодержание водных бактерий равно 1 кал/мг сырого вещества (4,186 Дж/мг).

5.2. Если продукцию бактерий и их дыхание синхронно измерить трудно, можно приближенно определить  $K_2$  по времени удвоения бактериальной биомассы и средней массе одной клетки. В этом случае расчет производят по формуле, предложенной Г.А.Инкиной:

$$K_2 = \frac{\bar{W}}{\bar{W} + 0,2032 \cdot g \cdot \tau}, \quad (3)$$

где  $\bar{W}$  - среднее энергосодержание одной бактерии планктона;  $g$  - время удвоения биомассы бактерий (в часах);  $\tau$  - скорость потребления кислорода одной бактериальной клеткой (мг $O_2$ /час).

Определение средней массы одной бактериальной клетки и времени удвоения биомассы бактерий производят общепринятыми способами.

Величину скорости потребления кислорода (СПК) одной бактериальной клеткой ( $\tau$ ) определяют по данным об интенсивности потребления кислорода водными бактериями. Средняя СПК одной бактерией в незагрязненных водах при  $20^\circ$  может быть принята равной  $0,13 \cdot 10^{-9}$  мг  $O_2$ /кл.сутки.

Показано, что при этом допущении ошибка в оценке  $K_2$  будет меньше, чем различие между средней и частной СПК одной бактерией. Величина  $\tau$  может быть установлена более дифференцированно, по ее зависимости от скорости роста ( $P/V$ ) бактериопланктона в исследуемом водоеме.

Считается, что потребление кислорода одной планктонной бактерией покоящихся ( $P/V = 0$ ), слаборастущих ( $P/V$  за сутки до 0,5) и быстрорастущих ( $P/V$  за сутки более 0,5) популяций составляет соответственно  $0,1 \cdot 10^{-9}$ ,  $0,15 \cdot 10^{-9}$  и  $0,3 \cdot 10^{-9}$  мг  $O_2$ .

Расчет  $P/V$  - коэффициента за сутки, или среднесуточной удельной скорости роста бактериопланктона, производят по формуле:

$$(P/V)_{\text{сут}} = \frac{0,693 \cdot 24}{g} = \frac{16,63}{g} \cdot \text{сутки}^{-1},$$

где  $g$  - время удвоения бактериальной биомассы (в часах).

Учитывая величину  $P/V$ -коэффициента, берут наиболее вероятную для исследуемого водоема величину суточного потребления кислорода ( $\gamma$ ) планктонными бактериями при  $20^\circ$ . Очевидно, что для расчета  $K_2$  величины  $\gamma$  и  $g$  должны быть отнесены к одной и той же температуре. Обычно  $g$  определяется для температуры воды в водоеме во время наблюдений. Если  $\gamma$  - СПК при  $20^\circ$ , то либо  $g$  должно быть приведено к  $20^\circ$ , либо  $\gamma$  к той температуре, к которой относится  $g$ . Это можно сделать с помощью температурной поправки

$$g = 2,3^{0,1(t_2 - t_1)}.$$

При переходе от температуры  $t_1$  к  $t_2$  значение  $\gamma$  надо умножать, а  $g$  делить на  $q$ . Когда переходят от более низкой температуры к более высокой,  $(t_2 - t_1) > 0$  и  $q > 1$ , в обратном случае  $(t_2 - t_1) < 0$  и  $q < 1$ .

Зная  $K_2$  и траты на обмен бактерий ( $R$ ), продукцию бактерий за единицу времени можно рассчитать по формуле:

$$P = K_2 \frac{R}{(1 - K_2)}.$$

Этот способ определения продукции полезен при ориентировочных расчетах. Обычно пользуются так называемым "средним коэффициентом  $K_2$  бактериопланктона", исходя из того, что бактериопланктон, как установлено, использует на рост от 30 до 60% энергии, получаемой с пищей.

Средние значения  $K_2$  бактериопланктона, как правило, составляют в евтрофных водоемах 0,5, в олиготрофных — 0,3-0,4, в мезотрофных 0,1-0,2.

За среднее значение  $K_2$  бактериопланктона рекомендуется принять величину 0,35, которую следует использовать для ориентировочных расчетов продукции бактериопланктона по известным величинам трат на обмен или для расчета трат на обмен по известным величинам продукции, согласно приведенным выше уравнениям (1) и (2).

## 6. Количественный учет бактерий донных отложений и оценка их функциональной активности

6.1. Подобно тому, как и при сборе проб бактериопланктона, количество станций при отборе проб грунта и частота их взятия определяются назначением работ. Число станций определяется количеством наиболее существенных для водоема биотопов и занимаемой ими площадью.

Для оценки содержания бактерий в грунтах при кадастровых обследованиях озер пробы грунта следует брать на тех же станциях, где отбираются пробы бактериопланктона.

При проведении сезонных или многолетних исследований на модельных водоемах выделяются 2-3 стационарные станции, которые определяют наиболее представительный, занимающий не менее 50% общей площади, биотоп. Пробы грунта в период открытой воды (май-октябрь) и зимой (январь, март) берутся не реже одного раза в месяц.

При проведении на водоемах интенсификационных рыбохозяйственных мероприятий основные усилия направляются не на оценку изменений, происходящих в отдельных биотопах, а на определение хода и направленности деструкционных процессов в водоеме в целом при различных формах интенсификации. Поэтому берет-

о прѣдельно малое количество станций (по одной в зоне литорали и пелагиали), но частота взятия проб увеличивается. Необходимость усиления микробиологического контроля возникает к концу лета — началу осени, в период максимального прогрева водоема и накопления в грунтах легкоокисляемого органического вещества. В условиях, способствующих активизации процессов бактериальной деструкции, желательно брать пробы грунта не реже двух-трех раз в месяц.

6.2. Отбор проб грунта для микробиологического анализа производится трубчатым стратометром или дночерпателями системы Бердки или Петерсена. Пробы грунта могут быть зафиксированы формалином для последующей их обработки в стационарных условиях. На 10 г грунта добавляется 0,5 мл 40%-ного формалина. Зафиксированные пробы могут храниться длительное время (более 6 месяцев). Пробы удобно хранить в небольших бюксах (25-50 мл) или широкогорлых склянках с крышками на резьбе. Необходимо следить за тем, чтобы пробы не подсыхали — над грунтом должен оставаться слой воды до 0,5 см.

Основными показателями для оценки роли бактериобентоса являются величины численности, биомассы, продукции и трат на энергетический обмен.

6.3. Определение численности бактериобентоса. Для обработки проб грунта в настоящее время наиболее широкое применение получил метод ультрафильтрации в модификации Г.А.Заварзина с предварительной обработкой пробы по упрощенному методу Черманова.

Для лучшего отделения бактерий от грунтовых частиц рекомендуется подщелачивание среды. Для этого навеска грунта вносится в слабый раствор щелочи — 0,005-0,0004 N. раствор едкого натрия. Готовится исходная болтушка грунта следующим образом. В колбу со стерильной водопроводной водой (50-100 мл) вносится навеска грунта (0,2-1,0 г). Таким образом получается суспензия с содержанием сетых долей грамма грунта (0,01-0,05) в 1 мл воды. Затем болтушку встряхивают в течение 5-10 мин, после чего мерной пипеткой на 10-20 мл она переносится на мембранный ультрафильтр. Применяются фильтры с диаметром пор 0,23-0,50 мкм. При обработке проб грунта с преобладанием песчаной фракции через мембранный фильтр профильтровыв-

вается 4–5 мл из грунтовой болтушки указанного объема. Для того чтобы во взвеси было меньше грунтовых частиц и для более равномерного распределения бактерий на фильтре фильтруемое количество болтушки может быть уменьшено до 0,5–1,0 мл при одновременном добавлении в фильтровальную воронку 10–20 мл стерильной воды.

Дальнейшая обработка фильтров (фиксация, окраска и т.д.) и подсчет бактерий производится так же, как при учете общей численности бактериопланктона (см. стр. 7).

Расчет численности бактерий в 1 г сырого грунта производится по формуле:

$$N = \frac{nKA}{v},$$

где  $n$  – средняя численность бактерий в одном поле зрения;  $K$  – отношение фильтрующей площади фильтра  $S'$  (в  $\text{мкм}^2$ ) к просчитываемой площади поля зрения  $S$  (в  $\text{мкм}^2$ );  $v$  – объем профильтрованной суспензии (мл);  $A$  – множитель для пересчета численности бактерий из разведения на 1 г.

**Пример расчета.** Рабочая площадь фильтра  $S'$  при диаметре  $d = 26$  мм будет  $\pi r^2 = 3,14 \cdot 13^2 = 530,66 \text{ мм}^2$  или  $530,66 \cdot 10^6 \text{ мкм}^2$  ( $10^6$  – коэффициент для перевода 1  $\text{мм}^2$  в 1  $\text{мкм}^2$ ).

В каждом поле зрения подсчет ведется в 9 клетках окулярного сетчатого микрометра общей площадью ( $S$ ) 900  $\text{мкм}^2$ . Тогда  $\frac{S'}{S} = \frac{530,66 \cdot 10^6}{900} = 589622$ .

Для сокращения счетной работы следует учесть, что отношение  $\frac{S'}{S}$  при использовании одного и того же фильтровального аппарата с определенным диаметром воронки и при определенном увеличении микроскопа будет величиной постоянной.

Например, при подсчете 20 полей зрения среднее число бактериальных клеток в одном поле зрения составило 50. Допустим, профильтровано 5 мл болтушки при разведении 0,01 г грунта в 1 мл. Тогда коэффициент пересчета бактерий на 1 г ( $A$ ) будет равен 100. Подставив в формулу соответствующие цифровые величины, получим, что

$$N = \frac{50 \cdot 589622 \cdot 100}{5} = 589 \cdot 10^6 \text{ кл/г} = 0,59 \text{ млрд. кл/г.}$$

6.4. Расчет продукции бактериобентоса. В настоящее время не имеется удовлетворительных способов прямого определения продукции бактерий донных отложений. Существующие методы основываются на ряде допущений. Рекомендуется применять способы учета продукции бактериобентоса, предложенные В.Г.Драбковской.

Первый способ: по потреблению кислорода донными отложениями и величине  $K_2$  придонного бактериопланктона. Таким образом, принимается, что потребление кислорода грунтами почти полностью идет за счет дыхания бактерий грунта, а коэффициент их энергетического обмена  $K_2$  такой же, как в придонном слое воды. Бактериальная продукция определяется по формуле:

$$P = \frac{K_2 \cdot D}{I - K_2},$$

где  $D$  — поглощение кислорода донными отложениями, определяемое по методу В.И. и В.А.Романенко.

Второй способ: при определении исходят из средней величины биомассы бактерий грунта и  $P/V$ -коэффициента, принимая для донных бактерий  $P/V$ -коэффициент, равный  $P/V$ -коэффициенту бактерий придонного слоя воды. Средняя биомасса донных бактерий рассчитывается на основании их численности и среднего объема бактериальных клеток, измеренных на окрашенных мембранных фильтрах (подобно расчету биомассы бактериопланктона). Биомасса бактериобентоса может быть выражена в миллиграммах бактериальной массы на  $I$  г сырого грунта.

Для ориентировочной оценки обеспеченности донных беспозвоночных бактериальной пищей рассчитывается биомасса и продукция бактерий на  $I$  м<sup>2</sup> для слоя грунта толщиной  $I$  и  $5$  см. В слое  $0-5$  см, как известно, сосредоточена основная масса бентосных организмов.

Для этого удельную биомассу бактерий, выраженную в мг/г грунта, переводят в г/м<sup>2</sup>. Принимается, что удельный вес грунта равен  $I$ , т.е. соответствует удельному весу воды. Это значит, что  $I$  см<sup>3</sup> грунта, как и  $I$  см<sup>3</sup> воды, соответствует  $I$  г. Масса грунта в  $I$  г занимает площадь в  $I$  см<sup>2</sup>. Чтобы установить

содержание бактерий на площади дна в  $1 \text{ м}^2$ , нужно массу бактерий в миллиграммах умножить на 10000.

Пример расчета. Биомасса бактерий составляет 0,40 мг/г, или  $0,40 \text{ мг/см}^2$ ,  $1 \text{ м}^2 = 10000 \text{ см}^2$ . Содержание бактерий будет равно  $4000 \text{ мг/м}^2$ , или  $4 \text{ г/м}^2$  в слое грунта 0-1 см и  $20 \text{ г/м}^2$  в слое 0-5 см.

6.5. Бактериальная деструкция органического вещества донных отложений. Количество окисленного бактериями органического вещества донных отложений определяется по поглощению кислорода в изолированном объеме воды над грунтом при постановке опытов в стеклянных цилиндрах, экспонируемых непосредственно в водоеме.

Расчет потребления кислорода  $1 \text{ м}^2$  поверхности дна производится по формуле, предложенной В.И. Романенко:

$$O_2 = \frac{п \cdot 8 \cdot Н \cdot \pi r^2 \ell \cdot 10000 \cdot 24}{50 \cdot \pi r^2 t},$$

где  $O_2$  - потребление кислорода илом на  $1 \text{ м}^2$  за время опыта (мг); п - разность между контролем и опытом при титровании 50 мл пробы (в миллилитрах тиосульфата); 8 - эквивалент кислорода; Н. - нормальность раствора тиосульфата;  $\pi r^2 \ell$  - объем воды над илом ( $r$  и  $\ell$ , см;  $\pi r^2$ ,  $\text{см}^2$ ); 10000 - площадь  $1 \text{ м}^2$ , выраженная в  $\text{см}^2$ ; 24 - пересчет суток в часы; 50 - количество надгрунтовой воды, взятой на титрование (мл);  $t$  - время инкубации пробы (в часах). После сокращения формула принимает вид:

$$O_2 = \frac{п \cdot Н \cdot \ell \cdot 1600 \cdot 24}{t} \text{ (мг/м}^2 \cdot \text{сутки)}.$$

Для выяснения направленности процессов минерализации органического вещества донных отложений исследования необходимо дополнять учетом отдельных физиологических групп бактерий.

Для выявления и количественного учета бактерий специфических групп требуется соблюдение стерильности при отборе проб и приготовлении основной болтушки грунта и разведений из нее. Из основной болтушки грунта в разведении 1 : 100 готовят ряд десятикратных разведений - 1 :  $10^3$ , 1 :  $10^4$  и т.д.

Из серии разведений производят посев 1-2 мл суспензии на элективные питательные среды для нитрификаторов, десульфурирующих бактерий и пр.

#### 7. Состав сред, применяемых при проведении основных анализов

Рекомендуются следующие среды:

1. Для выявления и учета гетеротрофных микроорганизмов предлагается брать 2,5 г сухого рыбопептонного агара (РПА) на 100 мл воды. Последний выпускается промышленностью и равноценен ранее применявшемуся МПА.

2. Для определения численности бактерий, разлагающих белковые вещества с выделением  $H_2S$ , также используется РПА. При выполнении посевов методом разливок в чашку Петри добавляют на кончике шпателя стерильный порошок углекислого свинца  $PbCO_3$ .

3. Для количественного учета денитрифицирующих бактерий следует пользоваться средой Гильтая без аспарагина с добавлением к ней 1,5%-ного агар-агара.

4. Наиболее оптимальной средой для обнаружения сульфатредуцирующих бактерий является среда Таусона в модификации А.А.Имшенецкого.

91