

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова

Биологический факультет

И. Г. Радченко, В. И. Капков, В. Д. Федоров

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО СБОРУ И АНАЛИЗУ ПРОБ МОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА

Учебно-методическое пособие
для студентов биологических специальностей университетов

*Допущено Учебно-методическим объединением
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов,
обучающихся по направлению 020200 «Биология»,
специальности «Биоэкология»
и другим экологическим специальностям*

Москва
2010

Рецензенты:

профессор кафедры биоэкологии и ихтиологии
Московского государственного университета технологий и управления,
доктор биологических наук *Ю. Г. Симаков*

профессор Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова,
доктор биологических наук *В. М. Хромов*

И. Г. Радченко, В. И. Капков, В. Д. Федоров

P15 Практическое руководство по сбору и анализу проб морского фитопланктона: Учебно-методическое пособие для студентов биологических специальностей университетов. – М.: Мордвинцев, 2010. – 60 с.: ил.

ISBN 978-5-904480-03-5

Настоящее руководство представляет собой впервые издающееся учебное пособие по сбору, обработке и анализу проб морского фитопланктона, включая идентификацию видов. Руководство разработано преподавателями кафедры гидробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова на основе многолетних полевых работ и морской практики студентов на Белом море. В работе над учебным пособием авторы использовали также публикации ведущих отечественных и зарубежных исследователей морского фитопланктона. Пособие является руководством по изучению фитопланктона, в котором наряду с практическими рекомендациями рассматриваются теоретические вопросы, включая постановку экологической задачи и анализ структуры сообщества.

Учебное пособие написано в соответствии с образовательными стандартами и предназначено для студентов – биологов и экологов, а также преподавателей, участвующих в проведении летней морской практики.

Рис. 71. Табл. 5. Библиогр. 32 назв.

УДК 574.5:581.325.3

Предисловие

Предлагаемое практическое руководство разработано и составлено на основе многолетнего опыта работы преподавателей кафедры гидробиологии Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по организации и проведению морской практики студентов-гидробиологов на Белом море. Перед авторами учебного пособия стояла задача создать руководство для студентов, впервые приступающих к работе непосредственно в море, в котором бы излагались современные и по возможности доступные в полевых условиях методы изучения морского фитопланктона. В работе над пособием вместе с собственными оригинальными разработками авторы использовали материалы ведущих отечественных и зарубежных исследователей морского фитопланктона.

Впервые в учебном пособии такого типа программный материал и практические рекомендации по отбору, обработке и хранению проб, идентификации видов, определению численности и биомассы водорослей разных таксономических групп излагаются в соответствии с образовательными стандартами, что существенно облегчает приобретение студентами навыков, столь необходимых для последующей самостоятельной работы. При этом каждый раздел пособия содержит обзор литературы по соответствующему вопросу и пошаговую процедуру применения методов изучения

фитопланктона, включая перечень необходимого оборудования и реактивов. В данном пособии рассматриваются также теоретические вопросы, касающиеся исследования функционирования фитопланктонного сообщества и даются практические рекомендации, вытекающие из работ отечественных и зарубежных фитопланктологов. Учебное пособие по сути представляет собой руководство по изучению морского фитопланктона, которое наряду с вопросами терминологии, изложения основных характеристик сообщества, включает постановку экологической задачи и последующий анализ структуры сообщества.

Особенностью данного руководства является наличие экспресс-определителя водорослей, снабженного большим количеством фотографий массовых видов морского фитопланктона, который создан на основе визуальных признаков, видимых в световом микроскопе, что крайне необходимо при работе студентов на морской практике.

Настоящее учебное пособие предназначено прежде всего для студентов-гидробиологов и студентов других экологических специальностей, преподавателей учебных заведений, участвующих в проведении летней морской практики, а также для специалистов, приступающих к изучению фитопланктона как составной компоненты морских экосистем.

1. Терминология и основные характеристики морского фитопланктона

Планктон представляет собой сообщество организмов, населяющих морские и континентальные водоемы, независимых от твердого субстрата как элемента опоры и не способных противостоять переносу течениями.

Термин «планктон» впервые был предложен немецким физиологом Виктором Гензеном [Hensen, 1887] для обозначения сообщества водных организмов со специфическим образом жизни в толще воды.

В состав планктона входят бактерио-, фито- и зоопланктон. Экологическая группа «фитопланктон» объединяет микроскопические одноклеточные и колониальные водоросли, свободно парящие в воде и осуществляющие фотосинтез в поверхностном горизонте водоема благодаря использованию солнечной энергии.

Основные компоненты фитопланктона в море – это диатомовые водоросли, динофлагелляты, кокколитофориды и некоторые другие жгутиковые. Цианобактерии, эвгленовые и зеленые водоросли менее обильны и значимы в морях, нежели в пресноводных водоемах.

Большинство видов фитопланктона не имеют органелл движения и пассивно дрейфуют в толще воды. Некоторые, однако, такие как динофлагелляты и кокколитофориды, способны двигаться при помощи жгутиков. Они могут осуществлять вертикальные миграции, в некоторых случаях пересекая пикноклин. Многие цианобактерии благодаря формированию газовых вакуолей и регуляции клеточного балласта также способны осуществлять вертикальные миграции.

Большая часть видов фитопланктона имеет плотность, превышающую плотность воды. Для уменьшения скорости опускания планктонные водоросли имеют специальные приспособления, препятствующие оседанию: мелкие размеры клеток, разного рода выросты – шипы, щетинки, перепонки, парашюты; форма тела, образование колоний, обильное выделение слизи, накопление в теле веществ, удельный вес которых меньше единицы (капли жира у диатомовых или некоторых зеленых водорослей, газовые вакуоли у цианобактерий).

Размеры водорослей планктона заметно варьируют и ранжируются от мелких (около 1 мкм в диаметре), даже более мелких чем некоторые бактерии, до очень крупных, таких как огромные водоросли рода *Ethmodiscus*. Виды *Ethmodiscus rex* и *E. gazellae* считаются самыми крупными одноклеточными клетками в морском фитопланктоне, их диаметр может достигать 1900 и 2000 мкм в диаметре [Identifying..., 1997]. Клетки или колонии с диаметром 0,2 – 2 мкм относят к *пикопланктону*, 2 – 20 мкм – к *наннопланктону*, 20 – 200 мкм – к *микропланктону* и 0,2 – 2 мм – к *мезопланктону* [Graham, Wilcox, 2000].

Большинство планктонных водорослей представлены одиночными клетками или сравнительно небольшими колониями. Редко колониальные или ценобиальные формы имеют больше 32 или 64 клеток в колонии. Число одновременно сосуществующих видов фитопланктона обычно от 10 до 100 и более.

Водоросли планктона в основном являются фотоавтотрофными организмами, хотя некоторые виды способны или даже предпочитают использовать для своей жизнедеятельности растворенные и взвешенные в воде органические вещества. Тем не менее, большинство организмов фитопланктона получают энергию путем фотосинтеза. Скорость роста разных видов микроводорослей существенно различается. Наиболее быстрорастущие клетки осуществляют несколько делений в сутки.

Кроме типично планктонных водорослей (*эупланктон* или *голопланктон*), жизненные циклы которых проходят в толще воды, в планктоне встречаются временно планктонные виды (*меропланктон*), которые проводят часть жизненного цикла, покоясь в осадках, а также нередко встречаются случайные виды из других мест обитания (бентосные, обрастатели) – *псевдопланктон* (синоним: *тихопланктон*).

Как правило, фитопланктон открытых вод океана отличается по видовому составу от фитопланктона прибрежных вод. Морские водоросли, преимущественно обитающие в прибрежных водах, относят к *неритическому планктону*, в открытом океане – к *океаническому планктону*, тогда как

виды, одинаково распространенные в обеих областях, называют *панталасными*.

Таким образом, в состав фитопланктона входят виды, различающиеся по размерам, обилию, скорости роста, трофическому статусу, приуроченности к биотопу и другим параметрам. Состав фито-

планктона изменяется в пространстве и времени, и для обсуждения пространственно-временной изменчивости используют понятие *структура фитопланктона*, подразумевая, как правило, относительное обилие видов.

2. Обоснование задачи

Основная задача фитопланктонолога состоит в оценке влияния различных экологических факторов на структуру фитопланктона. В рамках студенческой практики (на Белом море) возможно выполнение следующих заданий:

1. Анализ вертикального распределения фитопланктона. В данном случае определяется влияние изменения освещенности, температуры и солености на структуру фитопланктона. Для этого нужно отбирать пробы с нескольких горизонтов. В Белом море поверхностная толща воды представляет собой атлантическую высокобореальную водную массу [Бабков, Голиков, 1984], в которой выделяют три слоя. Верхний слой с глубиной около 5 м в защищенных и 10 м в открытых участках характеризуется короткопериодными изменениями показателей среды и соответствует слою волнового перемешивания. Промежуточный слой поверхностной водной массы соответствует горизонту с соленостным и температурным скачком (термоклинном) и залегает на глубинах от 5 – 10 до 15 – 20 м. Нижний слой, расположенный под слоем скачка, доходит до глубины, соответствующей проникновению осенне-зимней конвекции и в среднем ограничен глубинами 35 – 40 м. Летом в Кандалакшском заливе температура и соленость воды в верхнем слое в среднем составляют 15 – 16 °С и 25,5 ‰, соответственно; в промежуточном слое наблюдается резкий спад температу-

ры до 2 – 4 °С, а солености – подъем до 27 ‰. В нижнем слое температура и соленость воды составляют 0 – 2 °С и 27 – 28 ‰, соответственно. Интенсивность света в толще воды быстро затухает с глубиной по экспоненциальному закону. В Белом море в августе уже на глубине 15 м величина фотосинтетически активной радиации составляет 1 % и менее [Ильяш и др., 2010]. Следовательно, чтобы проанализировать вертикальное распределение фитопланктона, пробы рекомендуется отбирать с горизонтов 0, 3, 13 и 30 м.

2. Анализ горизонтального распределения фитопланктона. В данном случае выявляются гидрологические и гидрохимические факторы, влияющие на структуру фитопланктона. Для этого выбираются участки с различным гидрологическим и гидрохимическим режимом: места впадения реки и/или бытового стока, прибрежный и удаленный от берега районы. При этом *пробы рекомендуется отбирать в выбранных районах с глубины 3 м*, где наблюдается наибольшая концентрация фитопланктона в Белом море [Конопля, 1973].

3. Анализ сезонной динамики фитопланктона. Сезонная смена видового состава в Белом море происходит через 7 – 10 дней [Федоров и др., 1988]. Следовательно, для оценки сезонных изменений в структуре фитопланктона *пробы следует отбирать через 7 – 10 дней с глубины 3 м*.

3. Отбор проб фитопланктона

Способ отбора (места отбора, пространственные и временные масштабы отбора, выбор оборудования, количество проб) определяется в зависимости от поставленной задачи. Для сбора фитопланктона пригодны любые типы аппаратов, которые могут

быть опущены на заданную глубину и, после заполнения их емкости водой, автоматически закрыты различными способами. Наиболее часто для количественного учета фитопланктона сборы проб проводят батометрами разных типов, описание

конструкции которых приведено в многочисленных руководствах [Киселев, 1969; Современные методы..., 1983; Водоросли, 1989; Phytoplankton manual, 1978 и др.]. Для морских водоемов могут быть рекомендованы 2-х и 5-литровые батометры в зависимости от плотности фитопланктона в момент отбора проб. Для учебной практики применяется наиболее простая конструкция, предложенная еще в 1666 году Робертом Хуком [Hook, 1666], которая представляет собой прямую призму, изготовленную из органического стекла, емкостью 5 л. Прибор снабжен верхней и нижней крышкой, которые открываются при опускании батометра в воду и закрываются при подъеме обратным током воды (рис. 1). К батометру снизу крепится грузик, сверху – трос, размеченный на требуемые интервалы. Отбор проб фитопланктона батометрами позволяет учитывать водоросли всех размерных групп.

Планктонная сеть предназначена для тотального сбора планктона при протягивании сети через облавливаемый столб воды. Сеть состоит из металлического кольца и прикрепленного к нему конической формы мешка из мельничного газа, который изготавливается из шелка или капрона. Внизу сеть заканчивается металлическим или пластиковым стаканчиком, в котором собирается осадок планктона при фильтрации воды через мельничный газ. Описание планктонных сетей с чертежами их края приведено во многих практических руководствах по сбору планктона [Киселев, 1969; Руководство по методам..., 1980; Водоросли, 1989; Phytoplankton

manual, 1978 и др.]. В книге И. А. Киселева [1969] можно найти описание специальных конструкций сетей для лова планктона в прибрежных участках водоема среди зарослей растений, а также для лова планктона по течению или по ходу судна.

При сетном отборе проб в фитопланктонную сеть попадают крупные клетки водорослей и колонии более мелких форм, в то время как одиночные клетки небольших размеров в значительной степени могут «проскакивать» через фильтрующую поверхность шелка или капрона. Кроме того, при сетном отборе проб возникают трудности в определении точного объема профильтрованной воды. Поэтому фильтрационный метод не может быть безоговорочно причислен к количественным методам сбора. Правда, при фильтрации больших объемов воды сеть улавливает редкие виды из числа крупных форм, что может иметь первостепенное значение для оценки качества воды, особенно если среди крупных форм окажутся индикаторные виды – показатели сапробности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Цель работы. Отбор проб с помощью батометра и фитопланктонной сети.

Оборудование:

1. Батометр Хука объемом 5 л.
2. Ведро полиэтиленовое, двухлитровые бутылки для батометрических проб и баночки для сетных проб (количество определяется предполагаемым количеством проб).
3. Планктонная сеть (№ 76 шелкового мельничного сита с ячейей около 0,07 мм).
4. Диск Секки.

Задача. Отобрать пробы фитопланктона батометром для количественного учета водорослей и планктонной сетью – для качественного учета.

Процедура

Работа с батометром. Батометр с открытыми крышками опустить в воду. При достижении необходимой глубины сильно дернуть за трос (можно 2 – 3 раза для подстраховки), чтобы крышки закрылись. Обратный ток воды будет удерживать крышки закрытыми. Вынув батометр из воды, опустить его в ведро, осторожно приподнять нижнюю крышку и слить воду. Из ведра пробу можно

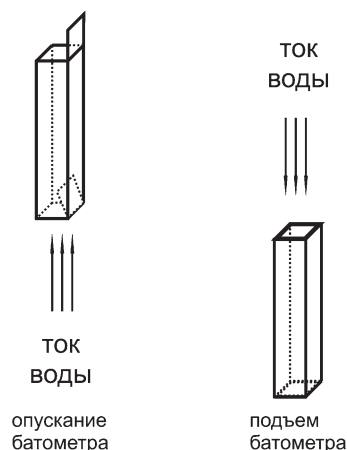


Рис. 1. Схема работы батометра

перелить в 2-х литровые бутылки или канистры для удобства переноса и для хранения некоторое время. Затем пробу следует сконцентрировать и зафиксировать (см. следующие разделы) для дальнейшего количественного счета.

Работа с планктонной сетью. Планктонную сеть опустить на нужную глубину, протянуть сеть горизонтально влево и вправо несколько раз, поднять на поверхность, слить концентрат в банки, плотно закрыть их крышкой.

4. Концентрирование фитопланктона

Численность фитопланктона в морских водах, за исключением отдельных видов во время их массового развития, очень низка, порядка нескольких клеток в миллилитре, поэтому для количественного учета всех водорослей необходимо концентрирование проб. Существует несколько методов концентрирования фитопланктона, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Выбор метода прежде всего определяется задачей исследования, исходной концентрацией водорослей, наличия соответствующего оборудования, удаленностью от лаборатории и т. д. Подробное описание различных методов концентрирования фитопланктона с анализом достоинств и недостатков каждого из методов и их модификаций можно найти в практических руководствах [Киселев, 1969; Федоров, 1979; Руководство по методам..., 1980; Phytoplankton manual, 1978 и др.].

В настоящее время в гидробиологической практике используются три основных приема концентрирования проб фитопланктона: осаждение, центрифугирование и фильтрация живого или фиксированного материала.

Осаждение

Метод Утермеля. Фиксированные пробы фитопланктона заливаются в цилиндры объемом 2 – 50 мл в зависимости от плотности фитопланктона, которые насажены на специальные камеры со стеклянным дном. Клетки водорослей оседают на дно (обычно 24 часа), заполняя камеру, которая просматривается снизу с помощью инвертированного микроскопа, объектив которого располагается не над столиком, а под ним. Счетные камеры могут иметь любые формы и высоту в зависимости от потребностей исследования, а подсчет клеток в камере производят с использованием объективов большего увеличения.

Отстойный метод. Фиксированные пробы в стеклянных банках или цилиндрах в неподвижном состоянии в затемненном месте отстаивают в течение нескольких часов или дней в зависимости от объема пробы. После осаждения планктона пробы концентрируют путем декантирования (сливания) по каплям среднего слоя воды с помощью тонкого стеклянного сифона с концом, загнутым вверх на 2 см. Сконцентрированный таким образом материал годен для микроскопического исследования в счетной камере.

Центрифугирование

Метод может применяться для концентрирования как живого, так и фиксированного материала. Рекомендуется использовать его для концентрирования живого материала, когда для микроскопического анализа исходную плотность достаточно повысить в 10 – 50 раз. Этого достигают центрифугированием 20 – 50 мл пробы в течение 20 – 30 мин при 1000 – 1500 об/мин. Супернатант осторожно удаляют сифоном, оставляя 1/10 – 1/50 первоначального объема. Осадок взбалтывают круговыми движениями в оставшемся объеме воды, и суспензию клеток просматривают в счетной камере.

Фильтрация

Метод прямой фильтрации пригоден для концентрирования живого и фиксированного материала. Метод удобен при обработке проб с низким содержанием неорганических солей и детрита, а также с малой плотностью фитопланктона. Для фильтрации может быть использован любой источник вакуума, обеспечивающий разрежение порядка 0,2 – 0,3 атм. В зависимости от цели применяются мембранные фильтры с разным диаметром пор.

Метод обратной фильтрации является наиболее щадящим для клеток фитопланктона, поскольку

вода проходит через фильтр снизу вверх. При таком слабом напоре воды хрупкие клетки не разрушаются, а мелкие клетки, размер которых меньше диаметра пор, не проходят через фильтр.

Считается, что принцип обратной фильтрации в наибольшей мере гарантирует сохранность всех групп фитопланктона. На морской практике кафедры гидробиологии МГУ им. М. В. Ломоносова концентрирование батометрических проб производят методом обратной фильтрации.

Метод обратной фильтрации

Существует несколько модификаций приборов для обратной фильтрации. Наиболее удобна при работе в полевых и лабораторных условиях установка для обратной фильтрации, предложенная Ю. И. Сорокиным. Устройство прибора и приемы работы с ним приводятся в статье И. Н. Сухановой [Современные методы..., 1983].

Установка для обратной фильтрации (рис. 2) состоит из двух основных частей: корпуса и крышки. Корпус включает в себя нижнюю часть камеры и крестовину-подставку, на которой крепится прибор. Верхняя часть камеры располагается в крышке. Между нижней и верхней частями камеры вставляется фильтр. В дно нижней части камеры и в боковые стенки верхней и нижней частей камеры ввернуты штуцеры, на которые надеваются резиновые трубки (отводы) с зажимами. Через боковой отвод нижней части камеры вода втекает, а вытекает из бокового отвода верхней части камеры. Из донного отвода сливается концентрат.



Рис. 2. Установка обратной фильтрации в раскрытом виде

В рабочем состоянии вся фильтрационная система выглядит следующим образом (рис. 3). Емкость с пробой (бутыль, ведро, канистра или кислотница) должна стоять на закрепленной к стене полке с бортиками. Если используется не мерная емкость, то до начала работ с помощью мерного стакана или цилиндра емкость следует разметить соответственно литрам или другим объемам для того, чтобы оператор знал, какую часть пробы ему удалось профильтровать в случае фильтрации не всей пробы. Объем профильтрованной воды можно определять по количеству фильтрата, прибавив к нему объем сконцентрированной пробы. Полка обычно крепится на высоте 40 см над поверхностью рабочего стола, где стоит установка; таким образом фильтрация идет под давлением 0,04 атм.

Фильтры. Для концентрации фитопланктона удобно использовать трековые мембраны отечественного производства. Трековые мембраны представляют собой тонкую перфорированную



Рис. 3. Работа установки обратной фильтрации

лавсановую пленку с глянцевой поверхностью толщиной около 10 мкм. Они устойчивы к действию кислот, но деформируются при длительной обработке горячими щелочами. Глянцевое покрытие делает возможным практически полный смыв клеток с поверхности фильтра. На практике обычно используются фильтры с диаметром пор 1 – 2 мкм. Фильтры вырезаются из полотнища по периметру крышки чашки Петри, которая по диаметру практически совпадает с диаметром установки обратной фильтрации. В процессе работы оказалось возможным трех-четырёхразовое использование фильтра в случае небольшого фитопланктона. Для этого отработавший фильтр следует слегка промыть в пресной или профильтрованной морской воде и положить в дистиллированную воду с небольшим (щепотка) добавлением стирального порошка до следующей фильтрации. Перед употреблением фильтр следует снова промыть пресной водой. Фильтры до начала работ должны быть слегка промыты, так как треки иногда забиты остатками лавсановой крошки. К тому же мокрые фильтры легче расправить.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Цель работы. Сконцентрировать пробу фитопланктона для количественного учета водорослей.

Оборудование, материалы и реактивы:

1. Камера обратной фильтрации.
2. Трековые мембраны. Фильтры нужно подготовить заранее, вырезав их по диаметру крышки чашки Петри.
3. Цилиндр на 2 литра.
4. Промывалка или груша.
5. Банки (флаконы) с закручивающимися крышками. Если для фиксации пробы будет использоваться раствор Люголя, лучше использовать прозрачные стеклянные флаконы, поскольку цветные флаконы затрудняют определение количества необходимого фиксатора, а пластиковые – втягивают в себя йод из раствора.
6. Стиральный порошок.

Задача. Сконцентрировать батометрические пробы методом обратной фильтрации и, при необходимости, отстойным методом.

Процедура

Фильтр вставляется в установку (рис. 2), крышка плотно привинчивается к корпусу. Бутыль, наполненная до необходимой метки (2 л) морской водой, ставится на полку. На все отводы надеваются зажимы. Боковой отвод нижней части камеры (рис. 3) открытый, опускается на дно бутылки и закрепляется в этом положении любым подручным способом (например, в конец отвода вставляется стеклянная пипетка). Для создания тока воды и равномерного заполнения нижней камеры без пузырьков воздуха необходимо открыть также донный отвод (подставить под него емкость объемом около 200 мл) и отсосать из него воздух с помощью груши. Вылившуюся из донного отвода воду следует перелить обратно в бутылку с пробой. После того как нижняя часть камеры заполнится, донный отвод следует закрыть зажимом и открыть боковой отвод верхней части камеры (подставить под него емкость объемом, равным или большим заданного объема фильтрующейся пробы) для заполнения водой верхней части камеры и начала фильтрации (для ликвидации воздушных пузырей камеру можно наклонять). Рекомендуется фильтровать до тех пор, пока вода не начнет медленно капать. При этом может профильтроваться от 0,5 до 2 л морской воды. Дальнейшая фильтрация не эффективна, так как требует очень длительного времени, а это сказывается на состоянии организмов в пробе. По окончании фильтрации прежде всего следует перекрыть боковой отвод нижней части камеры. Затем закрыть боковой отвод верхней части камеры. Два-три раза встряхнув камеру, следует слить концентрат (пробу) в приготовленную банку через донный отвод, наклонив камеру и открыв при этом боковой отвод нижней части камеры (следить, чтобы концентрат не вылился через этот отвод). Для ополаскивания фильтра можно ввести носик промывалки или груши в боковой отвод нижней части камеры и повторить процедуру. Фильтр таким же образом можно промыть обратным током воды через боковой отвод верхней части камеры, закрыв при этом боковой отвод нижней части камеры. По окончании фильтрации камеру и фильтр ополоснуть пресной водой.

Для дальнейшей обработки пробы фиксируются (см. раздел 5) и в таком виде могут храниться и транспортироваться.

Если плотность водорослей в пробе недостаточна для счета, пробу можно сконцентрировать дополнительно, используя отстойный метод. Данную процедуру можно проводить как с фиксированным, так и живым материалом. В случае работы с фиксированными пробами, они должны отстояться некоторое время для осаждения водорослей, что значительно уменьшит попадание клеток в поры фильтра при фильтровании. Некоторые наннопланктонные организмы опускаются с очень малой скоростью – порядка 1 см в 3 ч – поэтому время осаждения в часах должно быть, по крайней мере, в три раза больше расстояния в сантиметрах, характеризующего высоту столба концентрируемой пробы [Федоров, 1979].

Для отстаивания проба сливается в мерный цилиндр. После определенного периода времени

в цилиндр опускается или сифон (см. описание отстойного метода), или трубка, нижний конец которой затянут фильтром или мельничным ситом, из которого шьют планктонные сети. На другой конец трубки надевается резиновая груша. Трубкой может служить стеклянная микропипетка на 10 мл. Фильтр крепится на широкий конец трубки с помощью вырезанного из резинового шланга, соответствующего диаметру трубки, отрезка (около 5 мм длиной). С помощью груши вода медленно вытягивается из цилиндра, пока объем пробы не достигнет требуемого. Затем трубка вынимается, груша при этом не отпускается, и несколько капель сливается обратно в цилиндр для того, чтобы обратным током смыть прилипшие к фильтру клетки водорослей. Сконцентрированная проба сливается обратно в баночку.

5. Хранение и фиксация проб фитопланктона

Для дальнейшего анализа проб необходимо минимизировать происходящие в них с течением времени количественные и качественные изменения. Для этого пробы либо фиксируют, либо, если предполагается выделение культур водорослей, сохраняют в условиях, способствующих снижению физиологической активности всех организмов пробы. Рекомендации по хранению и фиксации проб фитопланктона взяты из руководства [Phytoplankton manual, 1978].

Хранение нативных проб

В водных пробах при пониженных температурном и световом режимах фитопланктон может сохранять жизнеспособность в течение некоторого времени. В сетных выборках или пробах, взятых во время цветения, период жизнеспособности может быть значительно короче из-за высокой концентрации водорослей. Для увеличения жизнеспособного периода рекомендуется снизить уровень физиологической активности гидробионтов.

Водные пробы, как рекомендует Трондсен, желательнее хранить в полной темноте при температуре 15 °С, если температура моря ниже 10 °С, или при 2 – 10 °С, если температура моря выше 15 °С [Phytoplankton manual, 1978]. Водные пробы, взя-

тые во время цветения, должны храниться также как и сетные выборки.

Сетные выборки должны быть не слишком плотными и храниться предпочтительно в большом объеме воды (250 – 1000 мл). Немного света необходимо для того, чтобы избежать истощения кислорода в пробе. Во избежание размножения гетеротрофных организмов, включая бактерии, температура хранения должна быть низкой (2 – 5 °С), даже летом. Пробы могут храниться или транспортироваться в стеклянных флаконах со стеклянными пробками, вставленных либо в пенопластовые коробки (это защитит от механического и термического повреждения), либо в отдельные банки с широким горлышком. В последнем случае стеклянные флаконы должны быть обернуты в тонкий слой пенопласта или бумагу, чтобы избежать механических повреждений.

Для сохранения живых проб в лаборатории, например для демонстрационных целей, может подойти холодильник с флуоресцентным освещением. Плотные пробы (сетные и другие пробы) быстро портятся; хрупкие клетки часто отмирают в течение часа после взятия пробы. Разбавление свежей морской водой способствует увеличению периода жизнеспособности организмов в сетных выборках.

Фиксация проб

К сожалению, ни один из известных фиксаторов не является идеальным по своим свойствам, надежностью консервирующим структуру всех особей фитопланктона в долго хранящихся пробах [Федоров, 1979; Водоросли, 1989; Phytoplankton manual, 1978 и др.]. Наиболее широко используются в качестве фиксаторов фитопланктона формалин и раствор Люголя. Оба фиксатора используются как самостоятельно, так и с различными добавками в зависимости от цели исследования. Например, в удаленных от берега районах с преобладанием панцирных динофлагеллят и диатомей можно применять кислый формалин; в тропических районах с доминированием кокколитофорид подходит нейтрализованный формалин; в прибрежных районах, где развивается значительное количество беспанцирных флагеллят, лучшие результаты дает кислый раствор Люголя.

Для беспанцирных (голых) динофлагеллят лучше всего подходит тетраоксид осмия (OsO_4). При этом пробы либо выдерживают в парах 2 %-го раствора, либо реактив добавляют в пробу. Однако его высокая токсичность, высокая стоимость и черная окраска масляных включений у многих динофлагеллят ограничивают его применение. Это наиболее эффективный фиксатор, но некоторые динофлагелляты при нем разрушаются. Глутаральдегид (2 – 5 %-й раствор) также дает хорошие результаты при фиксации некоторых голых видов, особенно при низких температурах. Несмотря на меньшую токсичность по сравнению с тетраоксидом осмия, глутаральдегид обладает неприятным запахом, что затрудняет микрофотографирование проб.

Рекомендуется обязательно анализировать живой материал для того, чтобы можно было установить, какие формы из присутствующих подвергнутся разрушению при хранении.

Фиксация формалином

Реагент – 20 %-й нейтрализованный водный раствор формальдегида. Рабочий раствор готовится разбавлением стандартного (40 %-го) раствора формалина дистиллированной водой до 20 %-го раствора. Так как кремниевые структуры могут растворяться в щелочном растворе, то для нейтрализации (обычно щелочного) раствора в 1 л 20 %-го раствора формалина добавляют 100 г гексаметиленететрамина ($(CH_2)_6N_4$). Раствор может быть подкислен и

уксусной кислотой, если в пробе отсутствуют кокколитофориды. Для этого смешивают в равных количествах стандартный раствор формалина (40 %) и концентрированную (ледяную) уксусную кислоту.

Преимущества метода. При правильной фиксации нейтральным формалином хорошо идентифицируются кокколитофориды, диатомеи, панцирные жгутиконосцы и большое количество голых флагеллят. Ингредиенты фиксатора обычно легко доступны, и сам фиксатор может долго храниться (в 20 %-м формалине не образуется осадка, как это происходит в стандартном (40 %-м) растворе формалина). Правильно фиксированные формалином пробы могут храниться несколько лет.

Недостатки метода. Формалин искажает форму клеток беспанцирных флагеллят, а также приводит к тому, что многие флагелляты теряют свои жгутики. Содержимое клеток обесцвечивается, что затрудняет разделение пигментированных и непигментированных клеток. Для обнаружения жгутиков требуется фазово-контрастная микроскопия.

Фиксация кислым раствором Люголя

Раствор Люголя – кристаллический йод в растворе йодида калия – наиболее часто используется при фиксации фитопланктона. Слабощелочной раствор Люголя (с ацетатом) лучше подходит для фиксации кокколитофорид, тогда как кислый раствор (с уксусной кислотой) – для фиксации флагеллят. 100 г KI растворяется в 1 л дистиллированной воды, затем в раствор добавляется 50 г кристаллического йода и 100 мл ледяной уксусной кислоты. Поскольку раствор близок к насыщающему, возможно образование осадка, который следует отфильтровать.

Преимущества метода. Основное преимущество состоит в том, что при фиксации большинство флагеллят сохраняют свои жгутики. Клетки окрашиваются в желто-коричневый цвет и поэтому легче замечаются при подсчете, хотя некоторые органические и неорганические частицы также могут окрашиваться. Благодаря окрашиванию нет необходимости в фазово-контрастной микроскопии, как это требуется при фиксации формалином. Ингредиенты достаточно доступны и рабочий раствор может храниться много лет.

Недостатки метода. Кислый раствор Люголя растворяет кокколиты, кремнезем также будет растворяться при длительном хранении. Раствор

Люголя даже без добавок с течением времени становится слабнокислым, что будет способствовать потере в пробе кокколитофорид. Йод со временем окисляется, поэтому пробы долго не хранятся. Через полгода (год) в пробы нужно добавлять свежий фиксатор. Многие организмы прокрашиваются интенсивнее, а большое количество крахмала в клетках затрудняет просмотр поверхностных структур, например щитки панциря динофлагеллят. Клетки, окрашенные йодом, можно отмыть, добавляя в пробы тиосульфат натрия.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

Цель работы. Фиксация батометрических и сетных проб и транспортировка их в лабораторию.

Оборудование, материалы и реактивы:

1. Раствор формалина кислый или нейтральный (в фитопланктоне Белого моря много диатомей и практически отсутствуют кокколитофориды).

2. Раствор Люголя кислый.

3. Пипетки градуированные.

4. Восковой карандаш или маркер.

5. Контейнер для транспортировки.

Задачи:

1. Зафиксировать сконцентрированные батометрические пробы раствором Люголя.

2. Зафиксировать часть сетной пробы формалином. Оставшаяся часть в дальнейшем будет использована для просмотра под микроскопом и идентификации живых клеток.

3. Подписать флаконы с пробами и упаковать их для транспортировки.

Процедура

1. В батометрические, сконцентрированные в камере обратной фильтрации, пробы по каплям добавить раствор Люголя до получения слабокоричневого цвета пробы: 0,1 – 0,2 мл (4 – 8 капель) на 50 мл пробы, хорошо перемешать.

Этот фиксатор используют только для батометрических проб; сетные пробы лучше фиксировать формалином. При отсутствии раствора Люголя можно зафиксировать формалином и батометрические пробы. Для этого добавить 50 мл пробы к 1 мл фиксатора (конечная концентрация формалина составит 0,4 %), сразу же взболтать пробу для обеспечения мгновенной полной фиксации.

2. В сетные пробы сразу же после взятия добавить формалин в количестве 1/3 части объема пробы, если проба плотная. Хорошо перемешать.

3. Флаконы с фиксированными пробами подписать, отметив дату сбора пробы, место работы, номер станции, глубину, орудие лова, объем исходный и после концентрирования и др. Упаковать пробы в специальный контейнер. Пробы следует транспортировать и хранить при низкой температуре и в темноте, в случае фиксации раствором Люголя, но не замораживать. Пробы рекомендуется держать вдали от работающих механизмов, поскольку вибрация способствует образованию нежелательных агрегатов и разрушению, например, покрывающих клетку кокколитов.

Для длительной транспортировки или хранения проб необходимо запечатать пробки флаконов либо пленкой «Parafilm», либо расплавленным воском, окунув туда перевернутые горлышком вниз флаконы. Это особенно важно при использовании пластиковых флаконов. Как показывает опыт, неплотно закрытые пробы долго не хранятся, вода в них испаряется, объем пробы уменьшается, следовательно увеличивается плотность фитопланктона. При этом проба с малым объемом воды может высохнуть полностью.

При хранении проб, фиксированных раствором Люголя, следует контролировать цвет проб и при необходимости добавлять новые порции фиксатора. Потери молекулярного йода из пробы зависят от условий хранения и увеличиваются на свету.

6. Идентификация видов фитопланктона

Целью идентификации водорослей является определение их таксономической принадлежности. Правильная идентификация видов крайне необходима при любых исследованиях функцио-

нирования водных экосистем, а также при использовании водорослей в системе биологического мониторинга и в биотехнологии.

Например, было обнаружено, что одна из форм

динофлагелляты *Amphidinium operculatum* продуцирует соединения, которые могут быть использованы для лечения онкологических заболеваний [Maranda, Shimizu, 1996]. Для того чтобы получить патент, необходимо было точно определить таксономическую принадлежность водоросли, используя ее структурные и молекулярные характеристики.

Основные рекомендации

Численность клеток основных групп – диатомей, динофлагеллят, кокколитофорид, а также цианобактерий, евгленовых, криптофитовых, хризофициевых, диктиохофициевых и празиофициевых водорослей представляет ценную экологическую информацию при определении закономерностей сезонной и пространственной структуры фитопланктона. Так, доминирование цианобактерий наблюдается только в солоноватоводных и субтропических и тропических водах. Диатомовые водоросли обильны и доминируют в арктических и антарктических водах, в холодные сезоны в водах умеренных широт и в прибрежных водах всех климатических зон. Кокколитофориды (чаще по числу видов) могут превосходить другие группы водорослей в океанических водах. Наибольшее число динофлагеллят наблюдается в теплых водах, довольно обильны они и в осеннем планктоне высоких широт в Северном полушарии. Массовая вспышка некоторых динофлагеллят и кокколитофориды *Emiliana huxleyi* вызывает изменение цвета воды в море. Это явление часто наблюдается в прибрежных водах умеренной зоны Северного полушария.

Идентификация водорослей только до рода в некоторых случаях достаточна при характеристике района отбора проб, поскольку многие роды, особенно среди динофлагеллят и кокколитофорид, имеют ограниченное распространение или обитают в основном в определенных географических и климатических зонах. В то же время отдельные виды рода *Ceratium* являются космополитами, другие виды этой водоросли распространены в тропических и субтропических водах, а *C. arcticum* обитает в арктических водах. Роды диатомовых водорослей *Nitzschia* и *Thalassiosira* также очень различаются в пространственном и сезонном распределении. Упоминание *Thalassiosira* без видового

названия недостаточно информативно, поскольку этот род представлен во всех типах вод, хотя отдельные виды рода имеют определенное местообитание и динамику роста (например, арктический вид *T. hyalina*, биполярный вид *T. antarctica*, и вероятно космополитный вид *T. gravida*).

Несмотря на стремление фитопланктологов идентифицировать водоросли до самого низшего таксономического уровня все же существуют ограничения, обусловленные методами фиксации, концентрирования и микроскопического определения. Известно, что флагелляты без жесткой клеточной стенки или внутреннего скелета часто трудно определяемы после фиксации. Концентрирование проб также разрушает подобные организмы. Однако организмы, не разрушенные полностью, все равно должны быть включены в просчет клеток фитопланктона под термином «монады». Этот термин установлен для мелких клеток (до 10 мкм) с более или менее сферической формой. Если жгутики прикреплены к клетке, такие водоросли классифицируются как «флагелляты», хотя такие записи не более значимы, чем просто «монады и флагелляты». Несмотря на такую приблизительную «идентификацию», учет этих организмов необходим для оценки биомассы всего фитопланктонного сообщества.

Кокколитофориды характеризуются наличием известковых пластинок кокколитов, которые очень чувствительны даже к слабому подкислению. Более того, морфологические детали кокколитов, которые важны для определения, часто различимы лишь с использованием хорошей оптики. Только использование иммерсионного объектива (масляного или водного) и общего увеличения в 800 – 1000 раз позволит различить *Emiliana huxleyi* и *Gephyrocapsa oceanica*, диаметр клеток которых составляет 5 – 10 мкм. Однако и характерные и крупные кокколитофориды, такие как *Syracosphaera pulchra*, *Algirosphaera robusta* и *Coccolithus pelagicus* определяются под сухим объективом при общем увеличении в 400 – 500 раз. Во многих случаях, тем не менее, требуется электронная микроскопия.

Классификация динофлагеллят с жесткой клеточной стенкой (панцирные или текатные жгутиконосцы) основана на табуляции теки, однако планктонологи обычно используют для определения морфологические признаки водорослей: наличие

или отсутствие апикальных рогов, крыльев и других выростов, форма клетки и смещение пояса. Грубые характеристики, такие как более шероховатая тека *Gonyaulax* и его левостороннее смещение пояса по сравнению с *Protoperidinium*, обычно используются для выделения этих двух родов. Структура пластинок в некоторых случаях хорошо видна, но чаще требуется специальная обработка для рассмотрения этих структур.

При идентификация диатомовых водорослей до рода обычно возникают определенные трудности. Так, многие центрические водоросли имеют типичную макроскопическую морфологию. Идентификация на видовом уровне, например, *Chaetoceros* или большинства видов *Rhizosoleniaceae* возможна даже при простом счете проб фитопланктона. Трудности, однако, могут возникнуть, если *Dactyliosolen fragilissimus*, *Guinardia delicatula*, *Leptocylindrus danicus* и узкие формы *Cerataulina pelagica* присутствуют в одной пробе. Использование увеличения в 300 – 400 раз и фазового контраста позволяет различить эти виды. Такие водоросли, как *Lauderia annulata*, *Detonula pumila* и *Bacterosira bathyomphala* трудно отличить друг от друга, а также от *Thalassiosira spp.* Только некоторые из описанных 70 – 80 видов *Thalassiosira* могут быть определены с пояса, если клетки собраны в колонии. Структура вальвы является диагностическим признаком для данного рода и его видов, как и других диатомей, поэтому следует рассматривать клетки со стороны вальвы. То же самое с видами группы *Pseudo-nitzschia*: идентификация этих водорослей, основанная на виде со стороны пояса, не надежна, за исключением, возможно, *P. delicatissima* и *P. turgidula*. Пеннатные диатомовые водоросли в лентообразных колониях также лучше рассматривать со стороны вальвы для определения до вида или даже рода.

Использование более сложных методов, чем те, которые применяются обычно при подсчете численности фитопланктона, особенно необходимо для идентификации мелких флагеллят.

Большинство определителей фитопланктона составлены для определенного региона, поэтому использование их для других районов нецелесообразно. Так, в случае с *Pseudo-nitzschia seriata* (= *Nitzschia seriata*), ее частое упоминание в различных районах было подтверждено последующими

исследованиями. С другой стороны, диатомовую водоросль *Thalassiosira subtilis* часто путают с другими видами рода. Поскольку общим признаком рода является расположение клеток в крупных слизистых колониях, то без анализа структуры колоний, и структуры панциря три или четыре вида талассиозеры могут быть приняты за *T. subtilis*.

Идентификации водорослей только по рисункам следует избегать. Начинающие планктонологи часто обращают внимание на детали иллюстраций, которые в действительности не существенны. В то же время правильно написанный сопровождающий текст содержит больше информации о характерных морфологических признаках данного вида. Кроме того, большинство авторов сравнивают сходные виды и поясняют как они различаются.

Очень полезно перед анализом количественных проб просмотреть сетные пробы, собранные на той же станции, что и количественные, для ознакомления с некоторыми из присутствующих видов. При этом шанс определения редких, но также представляющих экологический интерес видов значительно возрастает. Сетные пробы также могут быть использованы для электронной микроскопии, например для идентификации мелких диатомей.

Электронная микроскопия изменила концепцию морфологии и таксономию большинства групп фитопланктона. При этом прояснились различия между таксонами всех уровней, а также появились новые подходы к созданию классификационных систем. Однако трудно произвести сравнение между тем, что видно в электронном и в световом микроскопе. Это наиболее очевидно для организмов, чьи тонкие морфологические структуры неразличимы под световым микроскопом.

Измерение линейных размеров клеток

Линейные размеры клеток служат важным диагностическим признаком и используются для расчета объема клеток. Измерения проводят с помощью окулярного линейчатого микрометра или более точным инструментом – винтовым окулярным микрометром (рис. 4), значение деления при заданном увеличении которого нужно предварительно определить. Для этого используют объективный микрометр (предметное стекло с нанесенной

на него линейкой). Цена деления линейки микрометра 0,01 мм (10 мкм):

1. Объектный микрометр помещают на столик микроскопа и при тех же увеличениях, при которых производят измерение клеток, находят линейку в поле зрения окулярмикрометра.

2. Совмещают деления неподвижной шкалы окулярного микрометра с линейкой таким образом, чтобы совпали первые, нулевые деления.

3. Находят другую пару наибольшего совпадения делений линейки и окулярмикрометра. Например, совпало 8-е деление окулярмикрометра и 48-е деление линейки (0,48 мм или 480 мкм). В результате одно деление окулярмикрометра будет равно 60 мкм.

4. В окулярмикрометре кроме неподвижной шкалы имеется и подвижная стеклянная пластинка с перекрестием и индексом в виде рисок. Пластинка связана с точным микрометрическим винтом и перемещается от его вращения, при этом по барабану микрометрического винта отсчитываются сотые доли одного деления неподвижной шкалы, в нашем примере – 0,6 мкм. Таким образом, диаметр клетки, составляющий по окулярмикрометру

2 деления неподвижной шкалы и 78 делений барабана микрометрического винта, будет равен, в нашем примере, 120 мкм + 46,8 мкм, или 166,8 мкм.

Литература для идентификации видов

К сожалению, не существует ни одного полного определителя планктонной флоры Мирового океана. Наиболее полные определители составлены для отдельных районов, многие из них устарели и могут ввести в заблуждение начинающего исследователя относительно названий видов, классификации и терминологии. Полезными дополнениями к определителю могут служить обзоры по отдельным родам, особенно богатым видами (иногда трудно различимыми), таким как род *Thalassiosira* [Макарова, 1988], род *Chaetoceros* [Гогорев, Макарова, 1999].

Рекомендуемые определители для фитопланктона Белого моря

Диатомовый анализ. Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Книга 2 / Под общ. ред. А. Н. Криштофовича. – Л.: Геолиздат, 1949. 342 с.

Диатомовый анализ. Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Книга 3 / Под общ. ред. А. Н. Криштофовича. – Л.: Геолиздат, 1950. 508 с.

Киселев И. А. Панцирные жгутиконосцы (Dinoflagellata) морей и пресных вод СССР. – М. – Л.: Наука, 1950. 280 с.

Определитель низших растений. Водоросли / Под общ. ред. Л. И. Курсанова. – М.: Советская наука, 1953. Т. 1. 396 с.

Определитель низших растений. Водоросли / Под общ. ред. Л. И. Курсанова. – М.: Советская наука, 1953. Т. 2. 312 с.

Identifying of marine phytoplankton / Ed. C. R. Thomas. – SanDiego: Academic Press, 1997. 858 с.

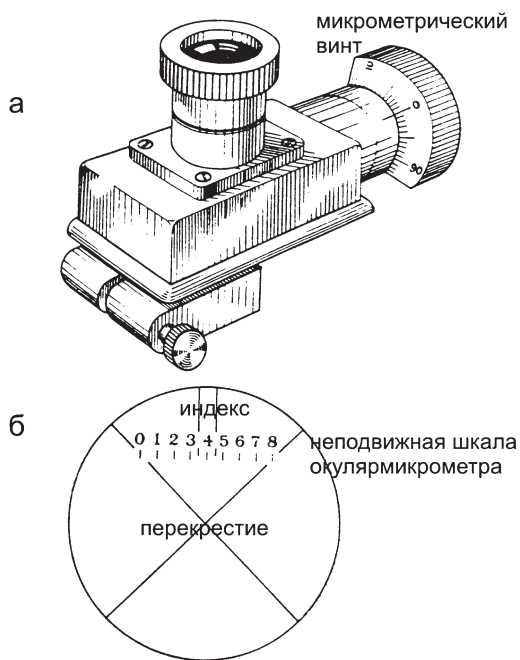


Рис. 4. Винтовой окулярмикрометр (а)
с видом под микроскопом (б)

7. Определение диатомовых водорослей

Многие крупные и часто встречающиеся в морском планктоне диатомовые водоросли вполне определяемы до вида при стандартном счете фитопланктона. Однако другие диатомеи, например собранные в лентообразные колонии, или мелкие, или слабо кремнефицированные, обычно трудно определяются до вида и даже до рода при обычном просмотре клеток под световым микроскопом. Поэтому сетные сборы, сопровождающие отбор количественных проб, можно использовать для создания специальных препаратов для более точного определения видов.

Анализ нативного материала в водном препарате под световым микроскопом

Анализ нативного материала обычно дает достаточную информацию для идентификации следующих родов и большинства их видов: *Bacterias-trum*, *Cerataulina*, *Chaetoceros*, *Corethron*, *Ditylum*, *Guinardia*, *Leptocylindrus*, *Lithodesmium*, *Odontella*, *Planktoniella*, *Rhizosolenia*, *Skeletonema*, *Stephanopyxis*, *Thalassionema* и *Thalassiothrix*. Эти диатомовые водоросли легко распознаются по форме колоний, морфологии клетки, хлоропластам и характерным структурам, таким как щетинки у *Bacterias-trum* и *Chaetoceros*, выросты у *Cerataulina*, *Corethron* и *Skeletonema*.

Другие планктонные морские диатомеи могут быть идентифицированы только при анализе структуры створки.

Структура створок некоторых видов просматривается в водных препаратах, например у *Actinocyclus spp.*, *Asteromphalus spp.*, некоторых *Coscinodiscus spp.*, *Fragilariopsis kerguelensis*, *Pseudo-nitzschia pungens*, *Roperia tessellata*. Однако у слабо кремнефицированных и тонко структурированных видов *Coscinodiscus*, *Navicula*, *Nitzschia* и *Thalassiosira* структура створки просматривается плохо. Для более детального исследования требуется изготовление препаратов для световой и/или электронной микроскопии.

Наиболее полный обзор методик по данному вопросу представлен в книге [Phytoplankton manual, 1978].

Анализ нативного материала с использованием постоянного препарата

Для изготовления постоянного препарата применяются специальные смолы с индексом преломления бóльшим, чем у диатомовых водорослей ($> 1,5$), в частности смола Pleurax с индексом преломления около 1,7 [von Stosch, 1974]. В [Phytoplankton manual, 1978] приведена таблица, по которой можно выбрать подходящую среду. В изготовленных препаратах могут исследоваться целые, неповрежденные панцири и колонии диатомовых водорослей, а также могут окрашиваться ядра живых клеток, указывая на то, что клетка была живой во время фиксации. Этот способ позволяет исследовать тонкие детали кремниевой стенки диатомей и строение пояса. Однако исследование структуры ореол, например, у видов *Coscinodiscus* и *Thalassiosira* затруднено при исследовании целых клеток, так как две створки накладываются друг на друга и таким образом искажают картину. В таких препаратах также трудно рассмотреть штриховку и структуру шва у *Navicula* и *Pseudo-nitzschia*. К тому же клеточное содержимое и органическое вещество клеточной стенки также затемняют изображение структуры створки и должны быть удалены.

Удаление органического вещества из клеток

Методы освобождения клеток диатомей от органического материала включают сжигание, а также использование ультрафиолетового излучения, ферментов или химических реагентов. Перед освобождением клеток от органического вещества из пробы необходимо удалить растворенные в морской воде соли. Для этого пробу промывают дистиллированной водой с помощью центрифугирования, пассивного осаждения или диализной трубки. Наиболее часто используются следующие методы очищения диатомовых водорослей от органического вещества [Identifying of marine phytoplankton, 1997]:

Метод вон Стоша – быстрый и обычно с хорошим результатом. Панцири диатомей разделяются на отдельные створки и освобождаются

от органического материала. Метод включает следующую процедуру:

1. Пробу сконцентрировать до почти сухого состояния.

2. Добавить равное объему пробы количество HNO_3 и тройное количество H_2SO_4 , прокипятить (примерно 3 мин) и охладить.

3. Промыть дистиллированной водой для удаления кислоты.

Метод Симонсена – надежный, но требует больше времени. Метод включает следующую процедуру:

1. Добавить в сконцентрированную пробу равное количество насыщенного KMnO_4 . Перемешать и оставить на 24 часа.

2. Добавить равное количество концентрированной HCl (осторожно, это опасно) в смесь пробы и KMnO_4 . Раствор приобретет темно-коричневую окраску. Осторожно подогреть на спиртовке, пока раствор не станет прозрачным и бесцветным или слабо желто-зеленым.

3. Промыть дистиллированной водой для удаления кислоты.

Методы с использованием ультрафиолетового облучения, перекиси водорода и ферментов позволяют сохранить панцири целыми без органического содержимого.

Очищенный диатомовый материал следует хранить в дистиллированной воде с добавлением нескольких капель смеси формальдегида и уксусной кислоты для предотвращения роста бактерий и грибов и растворения кремния. Можно добавить глицерин для предотвращения высыхания. Хранение в 96 %-м или разбавленном этиловом спирте предпочтительней, если материал будет в дальнейшем использован для электронной микроскопии. Сохраненный таким образом материал может затем использоваться без промывания.

Изготовление постоянных препаратов диатомовых водорослей

Для изготовления постоянных препаратов предлагается следующая процедура [Phytoplankton manual, 1978]:

1. Очистить (обезжирить) покровные стекла 96 %-м этиловым спиртом.

2. Поместить чистые покровные стекла на маркированный лоток.

3. Чистыми или одноразовыми пипетками нанести 1 – 4 капли, в зависимости от концентрации клеток, очищенной пробы на каждое покровное стекло. Желательно распределить клетки равномерно, без наложения. Если проба обильная, можно нанести одну каплю пробы с тремя каплями дистиллированной воды. Следует использовать пипетку для равномерного распределения воды по стеклу. Пипетка должна использоваться только для одной пробы во избежание загрязнения.

4. Препараты высушить, осторожно подогреть или оставив на ночь. Беречь от пыли.

5. Добавить 2 – 4 капли (в зависимости от вязкости) смолы с высоким индексом преломления, например Нугах, для придания контрастности панцирям.

6. Высушить препараты, осторожно подогреть или оставив на ночь, пока смола не станет твердой. Беречь от пыли.

7. Подготовить электроплиту для умеренного нагревания (около 200 °С), затем очистить спиртом и промаркировать предметные стекла. Предметные стекла разместить на плите таким образом, чтобы один конец предметного стекла для удержания выходил за край плиты и не нагревался.

8. Поместить предметное стекло верхней стороной на приготовленное покровное стекло с препаратом. Маркировка под предметным стеклом поможет отцентрировать покровное стекло. Быстро перевернуть, пока смола достаточно расплавлена для приклеивания, и вновь поставить предметное стекло с препаратом на плитку.

9. Препарат нагревать до тех пор, пока смола не распределится равномерно под всем покровным стеклом. Не доводить до кипения. Мягко постукивая по покровному стеклу деревянной палочкой, удалить пузырьки.

10. Охладить препарат. Излишки смолы обрезать ножом или удалить с помощью растворителя. Загерметизировать препарат лаком (можно лаком для ногтей). Приклеить постоянную метку.

Для первичного знакомства с морскими диатомеями можно в качестве пособия воспользоваться экспресс-определителем родов водорослей по морфологическим признакам, различимым под световым микроскопом. Экспресс-определитель диатомовых водорослей разработан на основе «Identifying of marine phytoplankton» (1997). Роды,

которые отсутствуют в Identifying of marine phytoplankton, описаны на основе Диатомового анализа (1949, 1950) с пометкой (ДА). В экспресс-определитель вошли только роды, присутствующие в фитопланктоне Белого моря [Ильяш и др., 2003]. Предложенный экспресс-определитель может быть полезен на начальном этапе обучения и работы. Для определения видов нужно использовать соответствующие определители, ссылки на которые даны в разделе «Идентификация видов фитопланктона».

Морфология и терминология диатомей

Морфология и терминология диатомовых водорослей представлена в сокращенном виде для облегчения пользования экспресс-определителем.

Панцирь диатомовых водорослей состоит из двух элементов – эпитеки и гипотеки. Эпитека состоит из створки – эпивальвы и пояскового ободка – эпицингулюма (рис. 5). Гипотека имеет аналогичные части: створку – гиповальву и поясковый ободок – гипоцингулюм. Эпицингулюм и гипоцингулюм составляют вместе поясок панциря. Панцирь диатомовых водорослей напоминает собой круглую или продолговатую коробку, у которой верх представляет собой эпивальву, дно – гиповальву, бока – два цингулума или поясковых ободка. Загнутая часть створки – *загиб створки* – бывает низким или высоким. Поясковый ободок в виде узкой ленты плотно охватывает край загиба створки, но не срастается с ним. Элементы пояскового ободка, которые располагаются проксимально (ближе) к створке, называют *вставочными ободками (копулами)*, иногда они отличаются формой и структурой

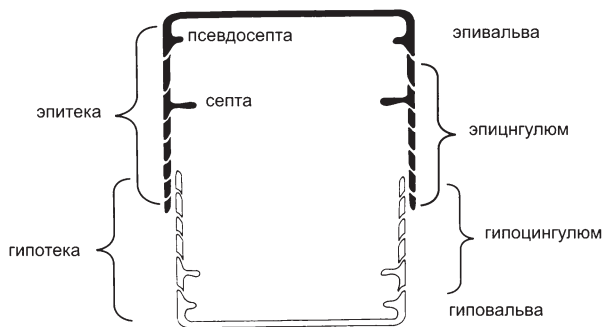


Рис. 5. Схема строения панциря диатомовых водорослей в поперечном разрезе

от дистальных элементов. Вставочные ободки бывают разной формы (рис. 6). Разрастание вставочного ободка в полость клетки приводит к образованию неполной кремниевой перегородки – *септы*, параллельной створкам (рис. 5). За счет увеличения числа вставочных ободков или их раздвигания обеспечивается увеличение объема (рост) клетки.

Форма панциря разнообразна и определяется формой створок и их высотой. Благодаря симметричности строения панциря через него можно провести *продольную (апикальную), поперечную (трансапикальную) и центральную (первальварную) оси симметрии*, длина которых соответственно определяет длину, ширину и высоту панциря, а также *продольную, поперечную и створковую (вальварную) плоскости симметрии* (рис. 7).

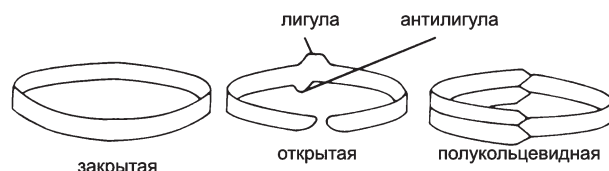


Рис. 6. Формы вставочных ободков панцирей диатомовых водорослей

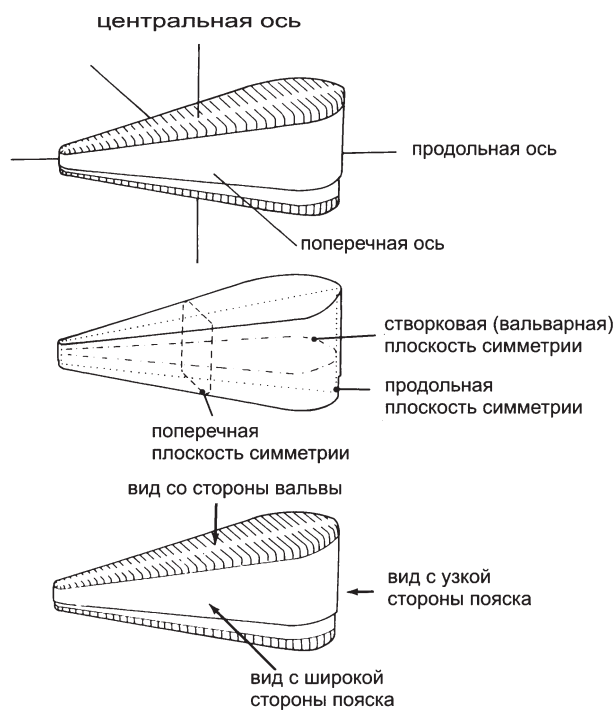


Рис. 7. Оси и плоскости симметрии панцирей диатомовых водорослей

Панцирь также имеет наружный и внутренний рисунки, образованные различными структурными элементами (ареолы, штрихи и др.), тонкое строение которых различимо только в электронном микроскопе.

При неблагоприятных условиях среды диатомовые водоросли формируют *покоящиеся споры*, которые прорастают при наступлении благоприятных условий. Формирование спор обычно для центральных и редко происходит у пеннатных диатомей. Покоящиеся споры в первую очередь определяют по сильно окремненному панцирю. Морфология спор у некоторых видов сходна с таковой вегетативных клеток, в то время как у других видов споры и вегетативные клетки сильно отличаются. Различают три типа покоящихся спор: *экзогенные* – зрелые споры физически не контактируют с родительскими теками; *полуэндогенные* споры – гиповальва споры заключена в одной из тек родительской клетки; *эндогенные* – вся спора заключена в панцире родительской клетки.

Выросты клеток диатомей

Вырост – выступ панциря с гомогенно окремненными стенками.

Римопортула – *двугубый (лабиатный) вырост* – трубка или отверстие в стенке вальвы с внутренней сплюсненной частью или щелью с утолщенными краями (губами). Римопортулы принимают участие в экскреции слизи.

Фурторпортула – *вырост с опорами* – трубка, окруженная 2 – 5 камерами или сопутствующими порами, изолированными изогнутыми опорами. Через фурторпортулы выделяются хитиновые фибриллы, участвующие в формировании колоний.

Шип – закрытая или твердая структура, выступающая над поверхностью панциря.

Краевой гребень – гребень между поверхностью вальвы и загибом створки, сплошной или прерывистый, перфорированный или цельный.

Терминология,

специфичная для пеннатных диатомей

Ножной полюс (базальный полюс) и головной полюс (апикальный полюс) – в основном используются для клеток в зигзаго-, вееро- и почкообразных колониях, в которых соседние клетки соединяются поверхностями створки ножных полюсов; головной полюс – другой конец клетки.

Грудина (стернум) – вытянутая часть вальвы, где ареолы редки (относительно остальной части вальвы) или отсутствуют и которая часто утолщена первальварно.

Штрихи – ареолы, сгруппированные рядами, которые при рассмотрении при малом увеличении выглядят параллельными линиями.

Шовная система – одна или две продольных щели в стенке вальвы.

8. Экспресс-определитель родов диатомовых водорослей

В *экспресс-определителе* даны только роды водорослей, встречающиеся в фитопланктоне Белого моря. Если род представлен одним видом, указывается его видовое название. *Экспресс-определитель* составлен на основе «*Identifying of marine phytoplankton*» (1997). Однако следует иметь в виду, что применение современных методов исследования водорослей (электронная микроскопия, анализ ДНК и другие) приводит к ревизии таксонов. Поэтому для удобства работы с определителями мы сохранили таксономическую систему и названия родов и видов, предложенных «*Identifying of marine phytoplankton*», в скобках – синонимы из «*Диатомового анализа*» (1949, 1950). Современное название вида следует искать на сайте <http://www.algaebase.org>.

(ДА) – роды, описание которых отсутствует в «*Identifying of marine phytoplankton*», но имеется в «*Диатомовом анализе*». Фамилии авторов родов и видов не приведены, их можно уточнить в современных определителях или на сайте <http://www.algaebase.org>. Изображения водорослей даны в основном в виде фотографий живых или фиксированных клеток в световом микроскопе, которые взяты из доступных сайтов в Интернете. Рисунки водорослей, фотографии которых отсутствуют в Интернете, взяты из *Диатомового анализа*.

1 (31) Панцири в виде плоских дисков или более или менее высоких цилиндров, барабанов, призм, реже бочонков и др. Вальвы круглые,

эллиптические или полигональные: **порядок BIDDULPHIALES** (центрические)

2 (7) Симметрия вальвы главным образом без полярностей (рис. 8). Контур вальвы в основном круглый. Хлоропласты обычно многочисленные, мелкие: **подпорядок COSCINODISCINEAE**

3 (4) Клетки одиночные, дисковидные. В Белом море встречается 4 рода:

– Центральное поле явно отличается от остальной части вальвы. Вальвы тангенциально волнистые...

Cyclotella (рис. 9)

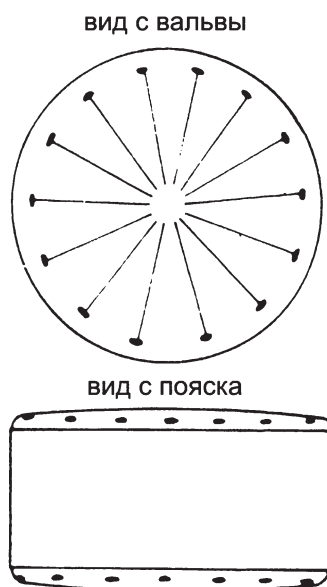


Рис. 8. Схематическая диаграмма центрических диатомей подпорядка Coscinodiscineae: симметрия без полярностей



Рис. 9. *Cyclotella* sp. Вид с пояса, показывающий волнистую створку. Клетка фиксирована раствором Люголя. Увеличение $\times 40$

– Рисунок ареол радиальный. При просмотре клетки со стороны вальвы заметны многочисленные фултопортулы в виде темных точек, рассеянных по всей поверхности вальвы. Нефиксированные клетки соединены в рыхлые цепочки органическими нитями, выходящими из фултопортул...

Porosira glacialis (*Lauderia glacialis*) (рис. 10)

– Рисунок ареол радиальный. Имеются 2 крупных, несимметрично расположенных отростка (макроримпортулы), и 1 – 2 кольца краевых шипиков (римпортул)...

Coscinodiscus (рис. 11)

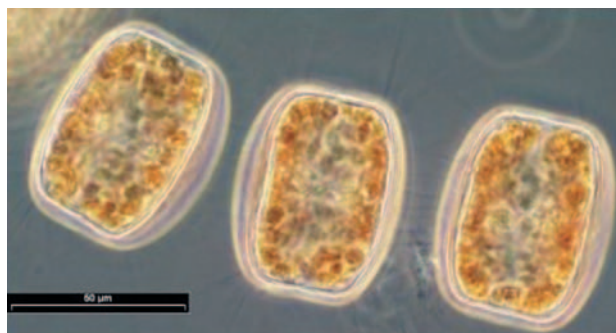


Рис. 10. *Porosira glacialis*. Колония клеток в световом микроскопе

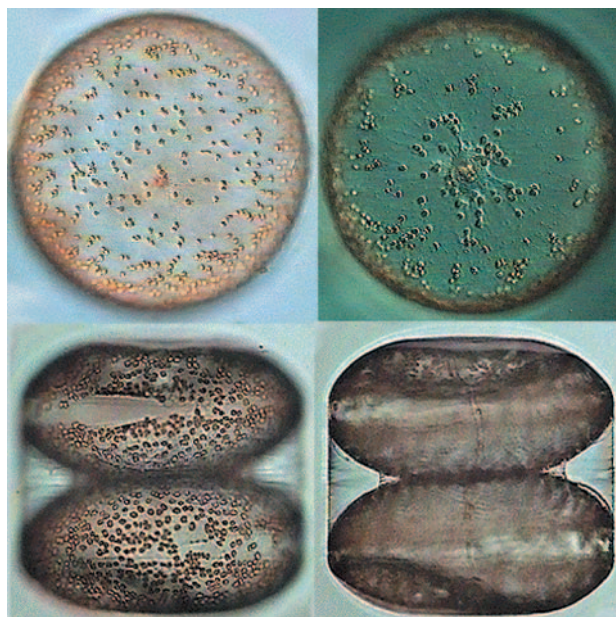


Рис. 11. *Coscinodiscus concinnus*. Живая клетка. Вверху – вид со створки. Внизу – вид с пояса. Диаметр клеток 150–500 мкм

– Ареолы в пучках. Краевая зона часто плотнее по ареолированности и/или отличается по направлению штриховки. Загиб створки глубокий и прямой...

Actinocyclus (Coscinodiscus) (рис. 12)

4 (3) Клетки в цепочках.

5 (6) Клетки соединены нитями. В Белом море встречается 1 род:

– Клетки обычно дисковидные, соединяются в цепочки органической нитью (или несколькими нитями). Цепочки (или клетки) погружены в слизь. В пробах цепочки иногда распадаются, а нити могут оставаться...

Thalassiosira

(*Coscinosira*, частично *Coscinodiscus*) (рис. 13)

6 (5) Клетки тесно прилегают друг к другу. В Белом море 6 родов:

– Цепочки соединены примыканием поверхностей валвь. Высота обычно длиннее диаметра клетки. Легко различима линзообразная структура между клетками. Клеточная стенка слабо окремнена. Радиальные ребра на створке идут от центра к краю. Покоющиеся споры гетеровальварные: первичная вальва

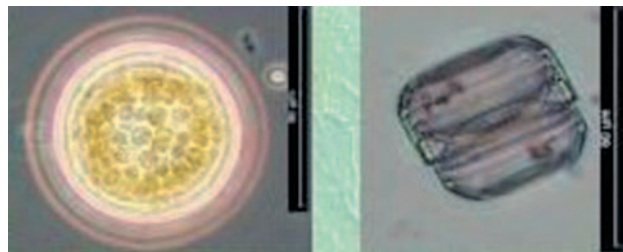


Рис. 12. *Actinocyclus octonarius*. Слева – вид со стороны вальвы. Справа – вид с пояска

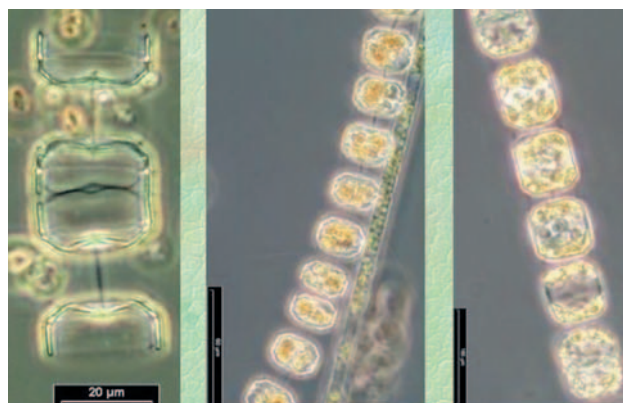


Рис. 13. *Thalassiosira nordenskioldii*. Цепочки клеток

с уплощенной поверхностью, вторичная – с большим возвышением в центре. Род с одним видом...

Bacteriosira bathyomphala
(*B. fragilis*, *Lauderia fragilis*) (рис. 14)

– Клетки в плотных цепочках, цилиндрические. Вальвы слабо окремненные. Поверхность вальв с радиальными ребрами и несколькими хорошо развитыми ареолами...

Detonula confervacea (рис. 15)

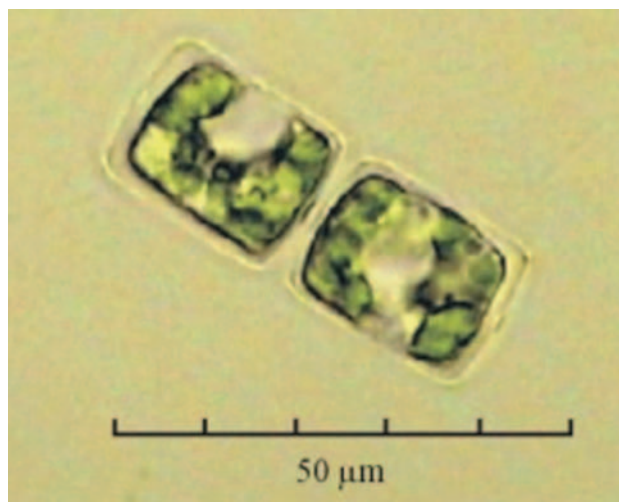


Рис. 14. *Bacteriosira fragilis*. Живые клетки в колонии

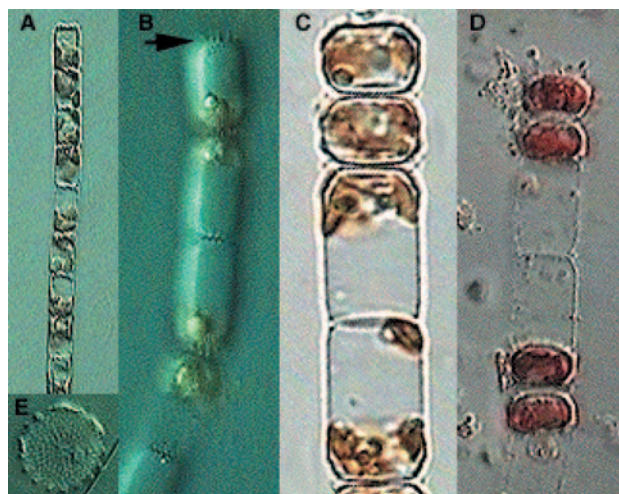


Рис. 15. *Detonula confervacea*. Клетки в цепочках. А – В – вегетативные клетки (стрелка – фултопортулы); С – вегетативные клетки и споры; D – споры; E – спора со стороны створки. А – С – живые клетки, D – клетка в растворе Люголя. Диаметр клеток 6 – 20 мкм, высота – 15 – 30 мкм

– Цепочки рыхлые, легко распадающиеся. Центральная ось немного длиннее диаметра. Поверхность вальвы с неясными радиальными ребрами. Центральное кольцо – выступающее. Род с одним видом...

***Lauderia annulata* (L. borealis)** (рис. 16)

– Клетки в цепочках соединены внешними трубками фултопортул, выстроенными в одно краевое кольцо, 1 – 2 хлоропласта...

Skeletonema costatum (рис. 17)

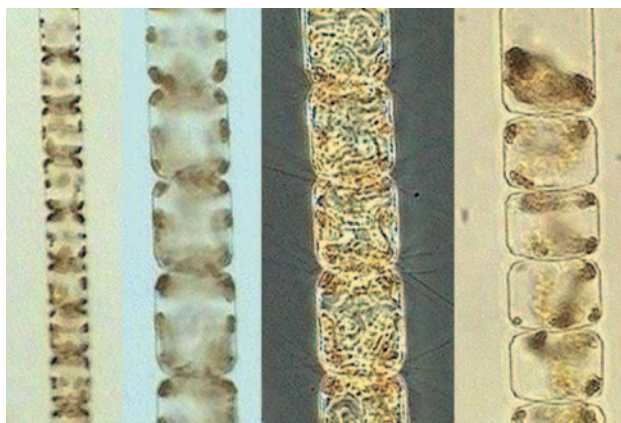


Рис. 16. *Lauderia annulata*. Клетки в цепочках. Диаметр клеток 20 – 75 мкм, высота – 26 – 96 мкм

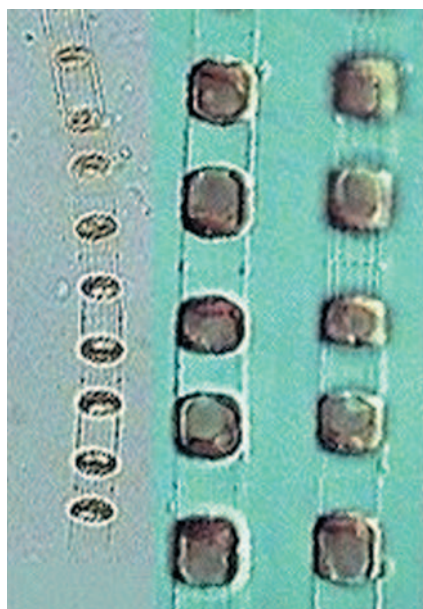


Рис. 17. *Skeletonema costatum*. Цепочки клеток с различных фокусов. Диаметр клеток 2 – 21 мкм, высота – 2 – 61 мкм

– Клетки в цепочках соединяются слизистыми подушечками, иногда короной, состоящей из крупных неправильных шипов, загиб створки высокий и сильно изогнут...

Melosira (рис. 18)

– Цепочки соединены примыканием поверхностей вальв. Клетки цилиндрические. Центральная часть вальв слегка выпуклая или вогнутая. Покоящиеся споры внутри ауксоспороподобной сферы. Хлоропластов несколько или много в виде зерен или круглых пластинок...

Leptocylindrus (частично *Dactyliosolen*) (рис. 19)

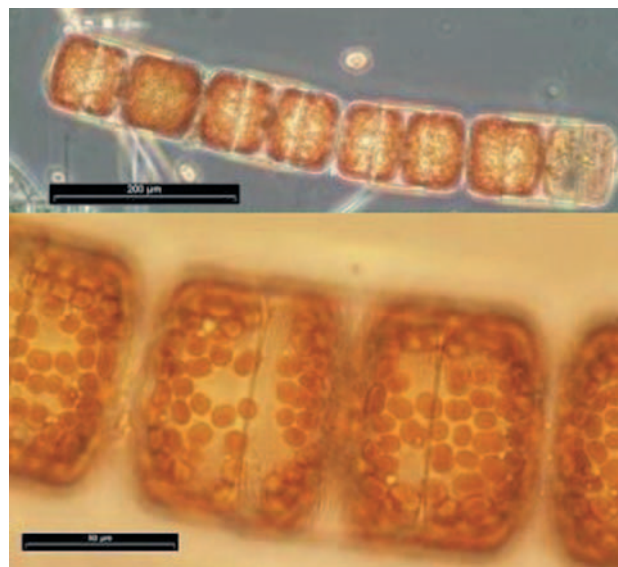


Рис. 18. *Melosira moniliformis*. Клетки в цепочках

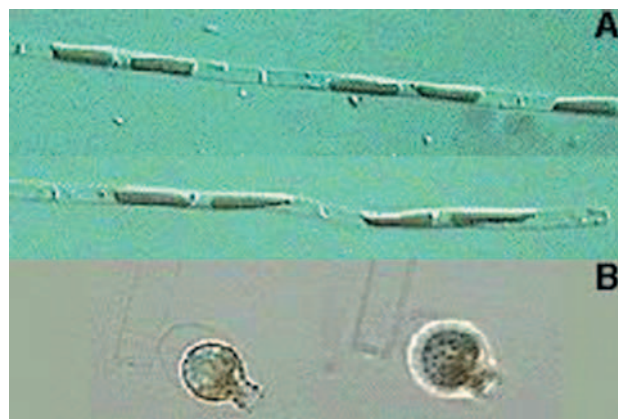


Рис. 19. *Leptocylindrus minimus*. А – две цепочки; В – споры. Диаметр клеток 1,5 – 4,5 мкм

7 (2) Симметрия вальвы полярна.

8 (15) Вальвы преимущественно однополюсные (рис. 20). Клетки в цепочках, цилиндрические, с одним отростком на полюсе. Хлоропласты многочисленные, мелкие: **подрядок RHIZOSOLENIINEAE**

9 (12) Вальва коническая или субконическая.

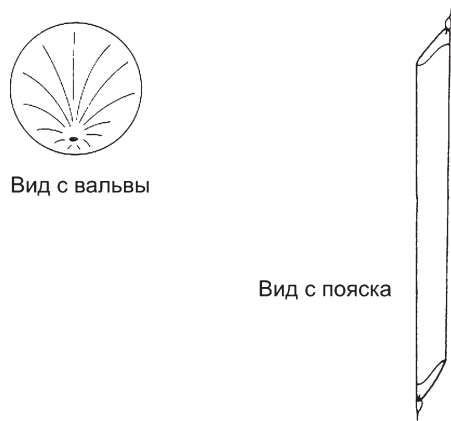


Рис. 20. Схематическая диаграмма центрических диатомей подряда Rhizosoleniineae: симметрия однополярная

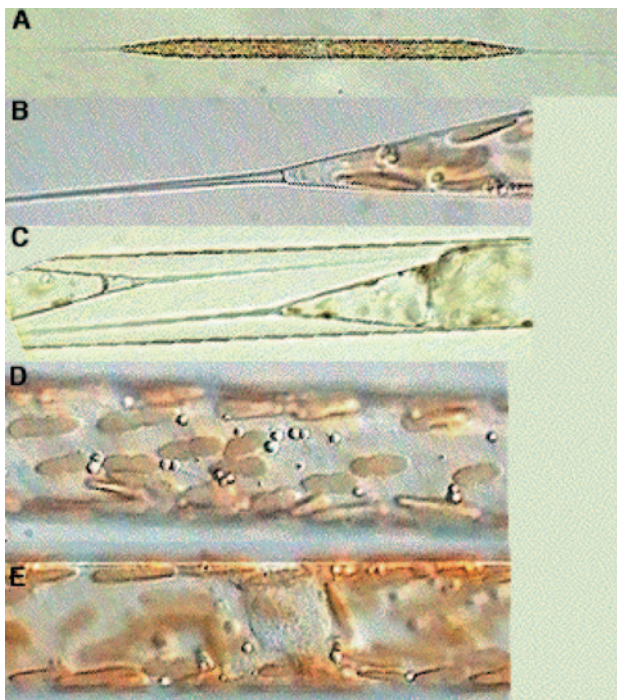


Рис. 21. *Rhizosolenia setigera*. A – живая клетка; B и C – концы клеток с выростом; D и E – средние части клеток с хроматофорами и ядром. Диаметр клеток 4 – 25 мкм

10 (11) Вальва с внешним отростком...

Rhizosolenia (рис. 21)

11 (10) Вальва с хоботком без отростка...

Proboscia alata (Rhizosolenia alata) (рис. 22)

12 (9) Вальва плоская или закругленная.



Рис. 22. *Proboscia alata*. A – C – части клеток (стрелка – усик), C – ауккоспорами. Диаметр клеток 2,5 – 13 мкм

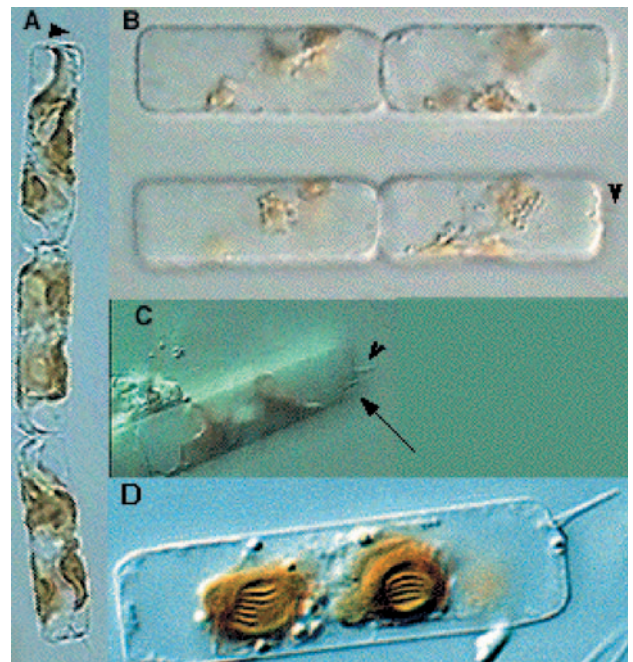


Рис. 23. *Guinardia delicatula*. A – C – живые клетки; D – два хлоропласта с пиреноидами. Острые стрелы – внешний вырост, стрелка – внешнее углубление. Диаметр клеток 9 – 22 (49) мкм, высота – 27 – 110 мкм

13 (14) Вставочные ободки открытые с лигулой и антилигулой...

Guinardia delicatula (*Rhizosolenia delicatula*) (рис. 23)

14 (13) Вставочные ободки полукольцевидные...

Dactyliosolen fragilissimus (*Rhizosolenia fragilissima*) (рис. 24)

15 (8) Вальвы преимущественно биполярные с выростами на полюсах (рис. 25): **подрядок BIDDULPHIINEAE**

16 (22) Клетки соединяются в плотные цепочки соприкосновением концов выростов, образуя окна между клетками. Симметрия биполярная. Выросты биполярные. Хлоропласты многочисленные, мелкие дисковидные.

17 (21) Выросты с шипом или крылоподобным вытягиванием или с заостренным концом.

18 (19) Выросты низкие с шипом или крылоподобным выступом. Окна между клетками узкие. Клетки закручены вокруг центральной оси. Вальвы от круглых до околосферических...

Cerataulina pelagica (рис. 26)

20 (19) Выросты обычно длинные. Клетки прямые с широкой стороны пояска. Цепочки иногда искривлены или повернуты вокруг длинной оси. Вальвы эллиптические...

Hemiaulus sinensis (рис. 27)

21 (17) Выросты с тупыми концами. Вальвы эллиптические. Цепочки иногда спиралеобразно закручены. Окна довольно широкие...

Eucampia (рис. 28)

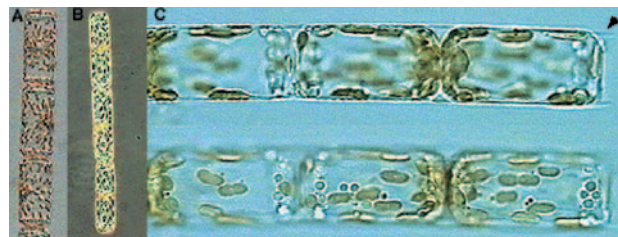


Рис. 26. *Cerataulina pelagica*. Цепочки клеток (острые стрелы – крылоподобный выступ). Диаметр клеток 7 – 56 мкм, высота – 55 – 120 мкм

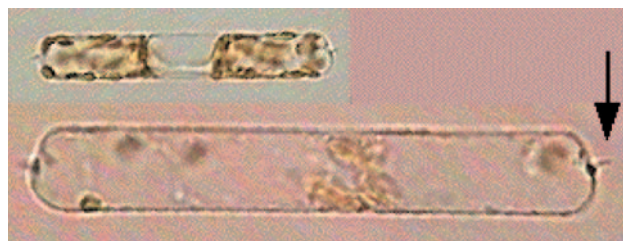
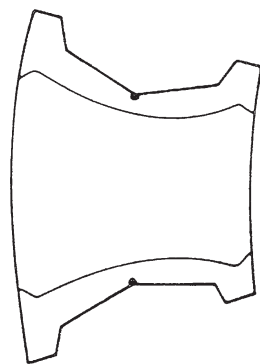


Рис. 24. *Dactyliosolen fragilissimus*. Две клетки (стрелка – вырост). Диаметр клеток 8 – 70 мкм, высота – 42 – 300 мкм



Вид с вальвы



Вид с пояска

Рис. 25. Схематическая диаграмма центральных диатомей подряда Biddulphiineae: симметрия вальвы биполярная

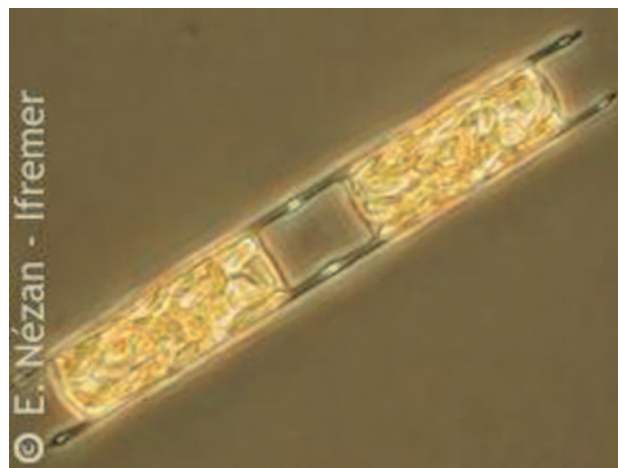


Рис. 27. *Hemiaulus sinensis*. Цепочка из двух клеток. Высота клеток – 12 – 90 мкм



Рис. 28. *Eucampia groenlandica*. Цепочка клеток, стрелка – ядро, острые стрелок – окна. Большой диаметр клеток – 10 – 33 мкм, меньший диаметр – 10 – 12 мкм, высота – 30 – 100 мкм

22 (16) Форма клеток и цепочек иная.

23 (28) Вальвы с длинными щетинками.

24 (27) Клетки одиночные или в цепочках, сформированных слиянием кремнезема между щетинками. Вальва с двумя щетинками, по одной на каждом конце апикальной оси. Обычны покоящиеся споры, всегда эндогенные и заметно отличные от вегетативных клеток: род *Chaetoceros*, в котором два подрода.

25 (26) Крупные формы. Щетинки толстые, часто очень длинные, бороздчатые и вооруженные заметными шипами. Хлоропласты – многочисленные мелкие гранулы по всей клетке, включая щетинки. Большинство океанические. Покоящиеся споры у беломорских видов отсутствуют...

Chaetoceros, подрод *Phaeoceros* (рис. 29)

26 (25) Щетинки тонкие, часто волосовидные, без хлоропластов; шипы и строение щетинок видны под световым микроскопом лишь у некоторых видов. Хлоропласты – одна или несколько пластинок или, реже, многочисленные мелкие гранулы. Виды в основном приурочены к прибрежным водам. Покоящиеся споры есть у многих видов...

Chaetoceros, подрод *Hyalochaetae* (рис. 30)

27 (24) Клетки одиночные или в парах. Щетинки довольно длинные (в 3 раза больше длины клетки), выходят от полюсов вальвы и выступают параллельно плоскости вальвы. Верхушки щетинок открыты и утолщены. Один или два хлоропласта. Покоящиеся споры отсутствуют.

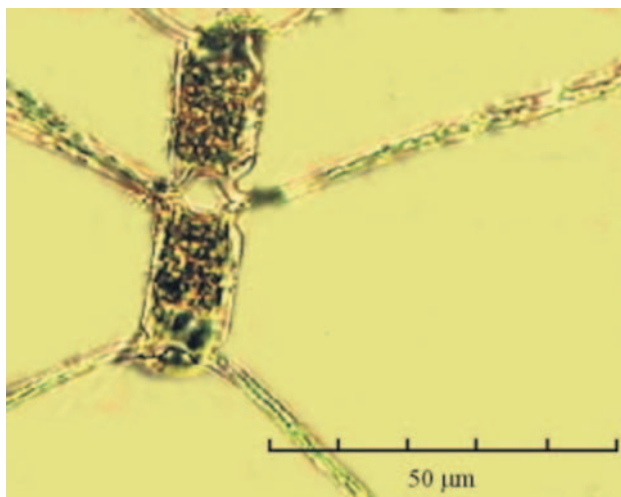


Рис. 29. *Chaetoceros concavicornis*. Клетки в цепочке

Могут прикрепляться к песчинкам или другим диатомеям...

Attheya septentrionalis
(*Chaetoceros septentrionalis*) (рис. 31)

28 (23) Форма клеток и цепочек иная.

29 (30) Клетки одиночные, с пояска прямоугольные, имеют краевой гребень, бахромчатый или прорезанный (базальная мембрана с целым краем, но перфорирована равномерно расположенными первальварными прорезями). Римопортула имеет длинный внешний игловидный отросток. Хлоропласты – многочисленные мелкие гранулы...

Ditylum brightwellii (рис. 32)



Рис. 30. *Chaetoceros curvisetus*. Цепочки клеток.
Диаметр клеток 6 – 40 мкм

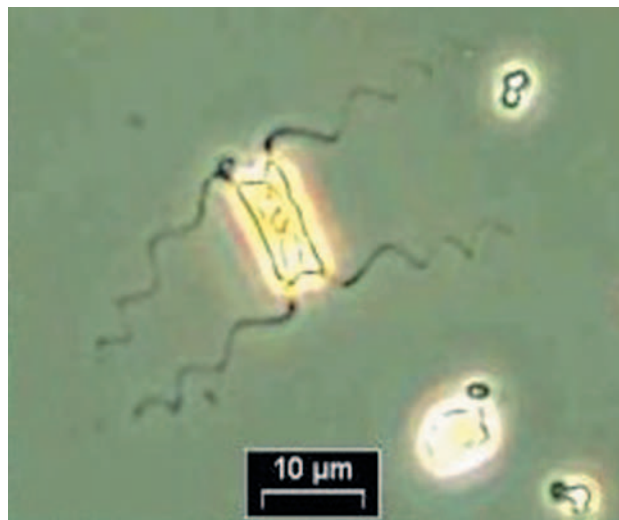


Рис. 31. *Attheya septentrionalis*

30 (29) Клетки в прямых (объединенные двумя выростами) или в зигзагообразных цепочках (объединены одним выростом). Вальвы эллиптические или ланцетовидные. Вырост (рог) с глазками на каждом полюсе. Многочисленные мелкие хлоропласты располагаются напротив стенки вальвы...

Odontella (Biddulphia) (рис. 33)

31 (1) Панцири с пояска линейные, таблитчатые или клиновидные. Вальвы вытянуты по продоль-

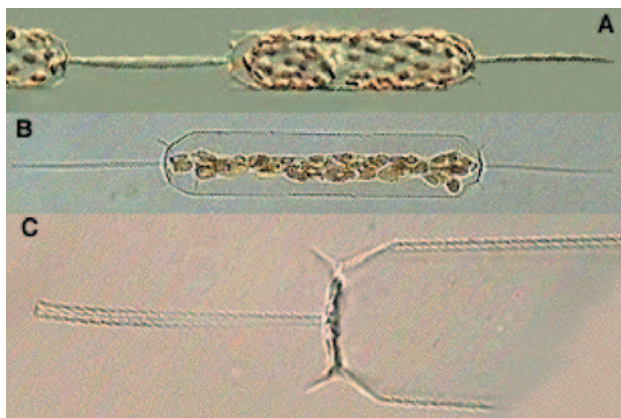


Рис. 32. *Ditylum brightwellii*. А – две живые клетки; В – целый панцирь; С – часть панциря. Диаметр клеток – 25 – 100 мкм, высота – 80 – 130 мкм

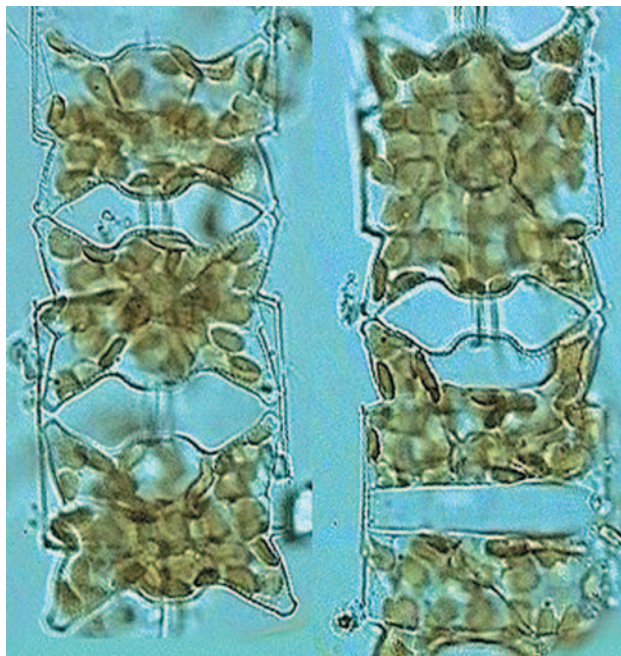


Рис.33. *Odontella aurita*. Цепочки клеток. Диаметр клеток 10 – 95 мкм

ной оси (линейные, ланцетные, эллиптические, булавовидные и т. п.): **порядок BACILLARIALES** (пеннатные)

32 (33) Клетки обычно одиночные. В Белом море встречается 7 родов:

– Вальвы более или менее уплощенные, мягко сигмовидные или почти прямые. Контур вальвы ланцетный. Шов прямой или более или менее сигмовидный и центральный. Два или четыре продольных хлоропласта, часто сильно изогнутых и лежащих скорее под поверхностью вальвы, а не вдоль пояска, много пиреноидов на хлоропласт...

Pleurosigma (рис. 34)

Gyrosigma (ДА) (рис. 35)

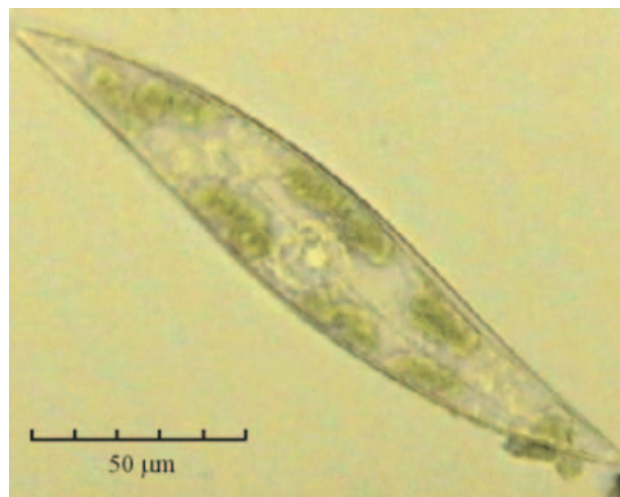


Рис. 34. *Pleurosigma angulatum*

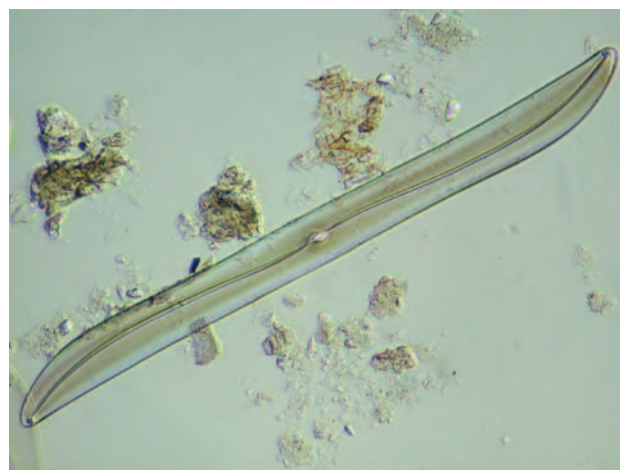


Рис. 35. *Gyrosigma balticum*. Длина клеток – 200 – 400 мкм, ширина – 20 – 40 мкм

– Панцирь скручен по продольной оси, диагонально симметричного строения. Створки ланцетные, S-образно изогнутый киль (парная, наружная крыло- или лопастевидная кремниевая структура) проходит вдоль по средней линии. Граница между створкой и килем резко выражена в виде особой линии разделения. Панцирь с многочисленными вставочными ободками, видимыми с пояска в виде поперечно исчерченных продольных лент. Два пластинчатых хроматофора, лежащих со стороны пояска...

Entomoneis (Amphiprora) (рис. 36)



Рис. 36. *Entomoneis paludosa*



Рис. 37. *Cylandrotheca closterium*. Длина клетки 30 – 400 мкм

– Панцирь веретеновидный с тонкими оттянутыми длинными концами (роstrумами), в веретеновидной части не закручен, в роstrумах либо не закручен или закручен слабо вокруг апикальной оси. Два хроматофора...

Cylandrotheca closterium (Nitzschia closterium)
рис. 37)

– Клетки линейные, шов эксцентрический...

Nitzschia (рис. 38)

– Клетки одиночные или в цепочках. Вальвы линейные, ланцетные или эллиптические. Шов



Рис. 38. *Nitzschia frigida*. Колония клеток.
Длина клеток – 32 – 64 мкм, Ширина – 4 – 5 мкм

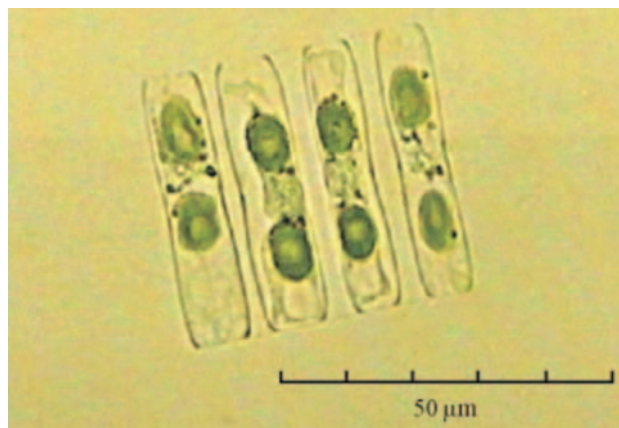


Рис. 39. *Navicula vanhoefenii*. Клетки в цепочке

обычно прямой, не поднимается на гребень. Клетки с пояска прямоугольные. 1 – 2 хлоропласта...

Navicula (рис. 39)

– Клетки одиночные или образуют пучковидно-веерообразные и пучковидно-звездчатые колонии. Форма клеток линейно-призматическая, редко слегка изогнутая по продольной оси, с пояска узколинейная, без вставочных ободков и септ. Створки от линейных до линейно-ланцетных. Концы большей частью сужены. Хлоропласты в виде мелких зернышек, дисков или немногих крупных пластинок...

Synedra (ДА) (рис. 40)

33 (32) Клетки образуют колонии. В Белом море встречается 8 родов:

– Клетки соединены поверхностями створок расширенных ножных полюсов в звездчатые, спиральные цепочки. Клетки с отличающимися концами как со стороны вальвы, так и со стороны пояска. Ножные полюса угловатые (коленчатые) с пояска и более менее округлые со стороны вальвы. Хлоропласты различаются у разных видов...

Asterionellopsis (частично **Asterionella**) (рис. 41)

– Клетки в звездчатых, зигзагообразных или веерообразных колониях. Клетки с пояска прямоугольные, со стороны вальвы изопольные или гетерополь-



Рис. 40. *Synedra* sp.



Рис. 41. *Asterionellopsis glacialis*. Длина клеток – 30 – 150 мкм

ные, варьируют от плавно расширенных в центре (игловидные, веретеновидные) до линейных или заметно расширенных в центре и на вершинах, или один апекс округлый, другой слегка заострен. Хлоропласты многочисленные, рассеяны по всей клетке...

Thalassionema (частично **Thalassiothrix**) (рис. 42)

– Клетки в лентах, вегетативные клетки прикрепляются друг к другу всей поверхностью вальвы, вершины покоящихся спор в цепочках не соединяются. С пояска клетки слегка коленчато-изогнуты. Шов вальвы на внутренней стороне изгиба. Вальва линейная с округлыми вершинами. Шов прямой, грудина узкая. Один (вероятно) Н-образный хлоропласт вдоль пояска...

Achnanthes taeniata (рис. 43)

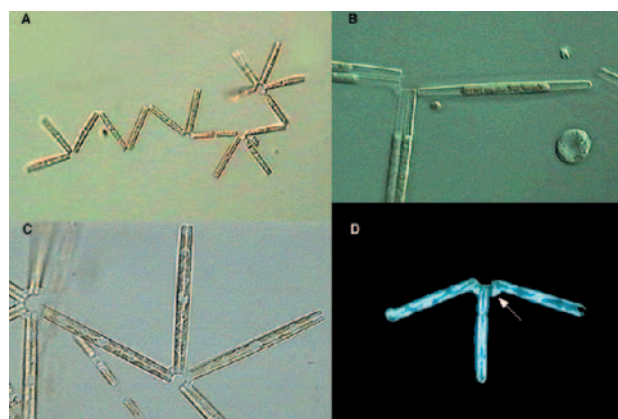


Рис. 42. *Thalassionema nitzschioides*. А – колония клеток; В – клетка со стороны вальвы; С – клетки с многочисленными хлоропластами, вид с пояска; D – слизистые подушечки между клетками (стрелка). D – в эпифлуоресцентном микроскопе с УФ возбуждением (клетки окрашены при мулином). Длина клеток – 10 – 110 мкм, ширина – 2 – 4 мкм

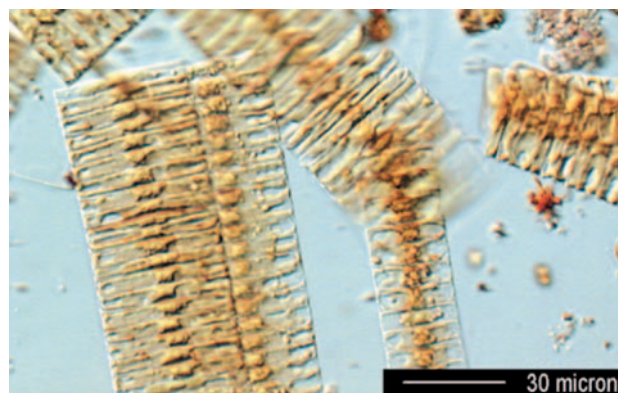


Рис. 43. *Achnanthes taeniata*. Колонии клеток

– Клетки в лентовидных колониях, внутри которых производят скользящие движения одна вдоль другой, формируя ленты с неровной, изменчивой краевой линией. Клетки с пояска прямоугольные, со стороны вальвы линейные, ланцетовидные, с оттянутыми концами. Шовная система слабо килеватая. Шов тянется от полюса к полюсу. Хлоропласты обычно в виде двух пластинок, одна на каждый полюс клетки...

Bacillaria (рис. 44)

– Клетки в зигзагообразных колониях. Панцирь с пояска таблитчатый с закругленными углами. В каждой теке по одному вставочному ободку и по две плоских или волнистых септы. Вальвы от линейных до линейно-эллиптических, с параллельными или слегка выпуклыми краями, очень редко края вогнутые или волнистые. Хлоропласты в виде пластинок, от одной до многих, заходящих лопастями в камеры, образованные септами...

Grammatophora (ДА) (рис. 45)

– Клетки в ленточных колониях, соединены всей или большей частью поверхности вальвы. Клетки с пояска прямоугольные. Вальвы от узкоэллиптических до ланцетных, широко эллиптических или округлых. Поверхность вальвы более или менее уплощена и не волниста. Апикальная ось часто гетеропольна. Полюса вальвы обычно головчато-округлены. Шов сильно эксцентричен, не выступает над общим уровнем вальвы. Хлоропласты в виде двух пластинок, лежащих вдоль

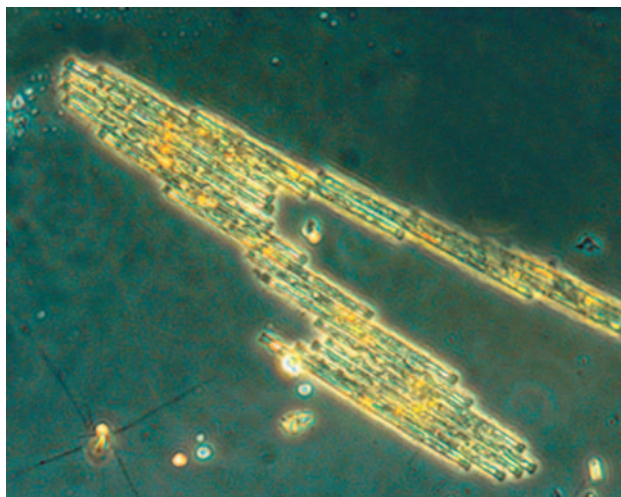


Рис. 44. *Bacillaria paxillifera*. Колония клеток. Длина клеток – 70 – 115 мкм, ширина – 5 – 6 мкм

пояска, одна – на какой-либо стороне средней трансапикальной плоскости...

Fragilariopsis (рис. 46)

Fragilaria islandica (ДА) (рис. 47)

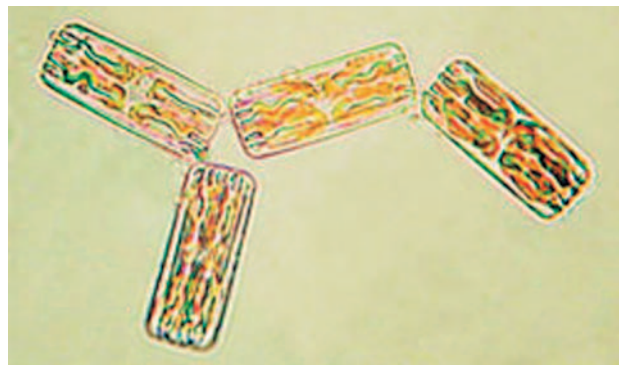


Рис. 45. *Grammatophora marina*. Колония клеток. Длина клеток – 18 – 100 мкм, ширина – 8 – 15 мкм

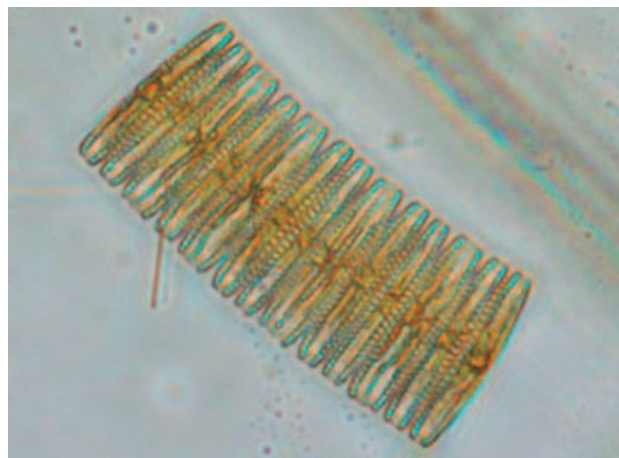


Рис. 46. *Fragilariopsis kerguelensis*. Колония клеток. Фазовоконтрастный микроскоп. Длина клеток – 20 – 41 мкм

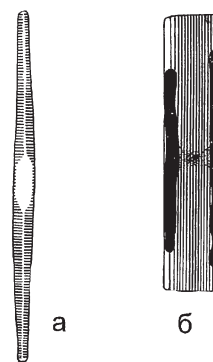


Рис. 47. *Fragilaria islandica*. а – вальва, б – вид клетки с хромофорами с пояска

– Клетки в ступенчатых цепочках, соединенные короткими или длинными наложениями кончиков валвь. Цепочки подвижные. Клетки с пояска сильно вытянуты, прямоугольные или веретенообразные. Валва от узколанцетной до веретеновидной и линейной с закругленными или заостренными концами. Поверхность валвы слегка искривлена или уплощена, не волниста. Шов сильно эксцентричный и не возвышается над общим уровнем валвы. Хлоропласты в виде двух пластинок, лежащих вдоль пояска, одна – на какой-либо стороне средней трансапикальной плоскости...

Pseudo-nitzschia (рис. 48)

При отборе проб в прибрежной зоне в составе фитопланктона можно встретить большое количе-



Рис. 48. *Pseudo-nitzschia seriata*. Колония клеток. Длина клеток – 90 – 160 мкм, ширина – 5,5 – 8 мкм

ство псевдопланктонных форм, которые при определенных задачах исследования также необходимо учитывать. Наиболее частыми из них являются виды родов *Cocconeis*, *Gomphonema*, *Licmophora*, *Navicula* и др. Определение этих форм следует проводить по Диатомовому анализу (1950) или другим определителям, включающим бентосные формы диатомовых водорослей.

9. Определение динофлагеллят

Выбор общей процедуры определения осложняется физиологическим и структурным разнообразием этой группы водорослей. В книге «Phytoplankton manual» (1978) представлены некоторые рекомендации по идентификации видов динофлагеллят под световым микроскопом, включая работу с живым материалом, окрашивание клеток, разобщение тек и учет цист.

Анализ нативного материала под световым микроскопом

Атекатные («голые») формы динофлагеллят определяются в большинстве случаев по форме клеток, а детальное рассмотрение пояска и борозд часто затруднено. Для этих целей лучше подходят различные типы мелкофокусных световых микроскопов, такие как Nomarski Interference Microscopy, а в обычных микроскопах со светлым полем для хорошего эффекта требуется нестандартная манипуляция либо открытием значительно больше, чем обычно, радужной диафрагмы, либо перемещением конденсора в сторону на малую величину.

Текатные (с целлюлозными пластинками) клетки для таксономии требуют определения полного «рисунка пластинок», хотя в обычной практике это часто затруднено, и идентификация основывается на размере, форме и шовных структурах водорослей. Оптические помехи клеточного содержимого

часто затегают текальные швы, следовательно пустые теки обеспечивают гораздо лучший анализ. При этом следует избегать изображение противоположной стороны при фокусировании через теку. При наличии клеточного содержимого швы можно рассмотреть с помощью мелкофокусной техники или при окрашивании, или с помощью сканирующего электронного микроскопа. Можно также вызвать плазмолиз клеточного содержимого добавлением сахарозы или поваренной соли для лучшего рассмотрения деталей теки.

Просмотр живых клеток

В просмотре как живых, так и фиксированных клеток динофлагеллят есть свои преимущества и недостатки. При работе с живыми клетками как в природном сообществе, так и в культуре можно исследовать пигментацию, движение, строение клетки, расположение органелл, репродуктивные стадии, размеры, форму и другие признаки. Чтобы рассмотреть внешние и внутриклеточные детали живых динофлагеллят, их нужно обездвижить. Существует несколько способов обездвиживания, наиболее простые из них следующие:

1. Предметные стекла с каплей пробы без покровного стекла помещают примерно на 3 мин в холодильник при 4 °С. Больше время экспозиции приводит к лизису клеток. Важно помнить, что

пробы из умеренных вод не должны охлаждаться или замораживаться как при транспортировке, так и хранения, поскольку многие хрупкие формы водорослей разрушатся. Пробы лучше хранить при температуре окружающей среды или обернуть контейнер с пробами мокрым полотенцем или бумагой, так как испарение способствует охлаждению проб. Эти пробы хранятся в темноте или при слабом освещении 24 – 48 часов, однако при этом обилие и видовой состав будут изменяться, что необходимо иметь в виду, если требуется количественный подсчет пробы.

2. Можно также приготовить препарат для работы со световым микроскопом и подождать, пока предметное стекло не нагреется от лампы микроскопа, что замедлит движение водорослей.

Динофлагелляты первым делом обычно сбрасывают жгутики, а беспанцирные клетки округляются и лизируются. Панцирные формы остаются нетронутыми или теряют свои теки.

Окраска водорослей

При работе в светлом поле микроскопа панцирные динофлагелляты часто требуют окраски для просмотра швов и формы пластинок. Для этого подходят Трипан голубой (также известный как Diamine blue 3B) или метод вон Стоша [von Stosch, 1969] с использованием $\text{HI}/\text{I}_2/\text{CCl}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH})_2$ ($\text{CCl}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH})_2$ – хлоралгидрат). Комбинации йода с окислителями окрашивают целлюлозу в голубоватый или красно-коричневый цвета.

Вон Стош предложил следующую процедуру (предпочтительно) для нефиксированного материала. Необходимо приготовить 2 маленькие пробирки, в одной – несколько миллилитров йодоводородной кислоты, в другой – 3,5 г хлоралгидрата, растворенного в 1 мл йодоводородной кислоты с несколькими кристалликами йода. Наиболее эффективная комбинация этих двух растворов варьирует в зависимости от имеющегося материала, и поэтому окраску начинают со слабого раствора хлоралгидрата/йода с добавлением под покровное стекло HI, увеличивая при этом подлив, если необходимо. Если пластинки утончаются к краю, то швы будут выглядеть светлоокрашенными зонами между красно-коричневыми пластинками.

Йодное окрашивание может быть неэффективным, если пробы фиксированы формалином.

В этом случае можно попробовать Трипан голубой в 0,2 – 0,3%-м водном растворе. Эта краска также эффективна для живого материала и в низкой концентрации, имея слабую токсичность, она не убивает клетки. Трипан голубой окрашивает теки в бледно-голубой цвет, при этом швы удерживают краску прочнее. Этот метод окраски комбинируется со смолой Pleurax для получения окрашенного постоянного препарата [von Stosch, 1974].

Фазовоконтрастная и дифференциально контрастная микроскопия обеспечивает так называемое оптическое «окрашивание», которая часто лучше любого химического окрашивания для наблюдения органелл, поверхностной орнаментации и формы пластинок.

Разобшение тек

Другой подход для исследования пластинок динофлагеллят, и в особенности мелких пластинок в брюшной зоне, состоит в контролируемом разобшении тек. Для этой цели подходит гипохлорид натрия (5 %) (промышленный «отбеливатель»), хотя препарат может выглядеть «грязно» из-за частичного окисления клеточного содержимого. Под покровное стекло заливают каплю концентрированного раствора гипохлорида, через несколько минут пластинки разойдутся, при этом следует слегка надавить на покровное стекло. Процедуру нужно выполнять последовательно, зарисовывая или фотографируя различные стадии разобнения перед тем как пластинки потеряются или дезориентируются.

Глицериновое желе помогает уменьшить движение пластинок и устанавливает их в тесной близости друг к другу [Graham, 1942]. Желе готовится следующим образом: растворяют 10 г желатина в 60 мл дистилляционной воды, добавляют 70 мл глицерина и 1 г жидкого тимолола (бесцветный кристаллический фенол $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$) в качестве фиксатора. Смесь аккуратно перемешивают, избегая образования пузырей. Клетки помещают на чистое предметное стекло с одним или двумя каплями глицеринового желе и накрывают покровным стеклом. Удаляют как можно больше воды из-под покровного стекла с помощью прижатой с одной стороны бумажной салфетки. Затем следует надавить на покровное стекло препаративной иглой и

осторожно двигать покровное стекло вперед-назад для разъединения пластинок. При использовании гипохлорида, добавить его с краю покровного стекла после отвода излишков жидкости.

Освобождение теки от остатков клетки – это лучший, а иногда единственный, способ для идентификации видов, поскольку он позволяет рассмотреть пластинки без фоновых помех от пигментов.

Для очищения динофлагеллят от внутриклеточного содержимого используют комбинацию сильного ультрафиолетового облучения и перекиси водорода. Метод требует очень сильной УФ лампы (1500 W или более) и эффективную охлаждающую систему [Holmes, 1967].

Другой способ включает флуоресцентный микроскоп для выявления окраски и швов пластинок панцирных клеток [Fritz, Triemer, 1985].

Для первичного знакомства с морскими динофлагеллятами можно в качестве пособия воспользоваться экспресс-определителем родов водорослей по морфологическим признакам, различимым под световым микроскопом. Экспресс-определитель динофлагеллят разработан на основе «Identifying of marine phytoplankton» (1997). В экспресс-определителе вошли только роды, присутствующие в фитопланктоне Белого моря [Ильяш и др., 2003]. Предложенный экспресс-определитель может быть полезен на начальном этапе обучения и работы. Для определения видов нужно использовать соответствующие определители, ссылки на которые даны в разделе «Идентификация видов фитопланктона».

Примечание по поводу цист динофлагеллят

Цисты динофлагеллят образуются в результате процессов размножения, питания, образования покоящейся стадии и могут значительно отличаться от клеток, их продуцирующих. Цисты варьируют от эфемерных, покрытых слизью клеток, до клеток с крепкой, устойчивой к кислотам клеточной стенкой. Их появление в планктоне свидетельствует чаще всего о наступлении неблагоприятных условий в окружающей среде. Покоящиеся цисты сразу после формирования опускаются на дно и представляют собой элемент бентоса. Их можно

не учитывать при подсчете клеток фитопланктона, однако при определенных исследованиях полезно отмечать, когда они наблюдаются. Изображения цист некоторых видов даны в «Identifying of marine phytoplankton» (1997).

Морфология и терминология динофлагеллят

Морфология и терминология динофлагеллят представлена в сокращенном виде для облегчения пользования экспресс-определителем.

Для облегчения пользования кратким определителем терминология и макроскопическая морфология динофлагеллят представлена в сокращенном виде. Большинство динофлагеллят – преимущественно одноклеточные монадные водоросли. Существует два морфологических типа клеток, различающихся по месту выхода жгутиков: десмоконтные и диноконтные (рис. 49). У *десмоконтных* клеток два неодинаковых жгутика выходят из апекса. Условно, часть клетки, которая направлена вперед при движении, считается передней, или апикальным полюсом (*анекс*), задняя часть клетки – антапикальный полюс, или *антапекс*. У *диноконтных* клеток два неодинаковых жгутика выходят из брюшной зоны. Диноконтные клетки обычно состоят из двух частей: апикальной *эпитеки* (*эпивальвы*, *эпикона* и др.) и задней *гипотеки* (*гиповальвы*, *гипокона* и др.), разделенных *поперечной бороздой* (*цингулюмом*, *пояском*), которая опоясывает клетку. *Продольная*

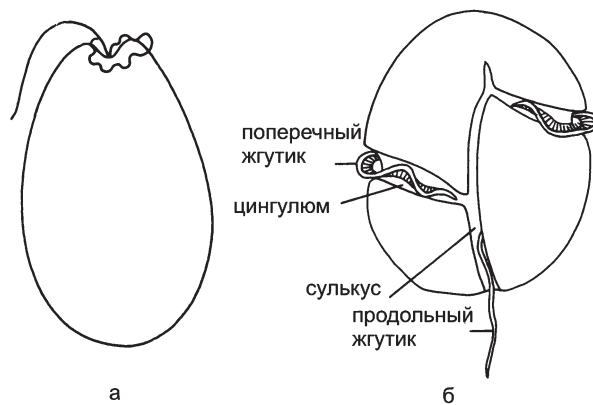


Рис. 49. Морфотипы клеток динофлагеллят: десмоконтный (а) и диноконтный (б)

борозда (сулькус) проходит по гипотеке от поперечной борозды к заднему концу клетки. В месте пересечения продольной и поперечной борозд имеется пора, из которой выходят два жгутика. Поперечный жгутик лежит внутри поперечной борозды, а продольный – в продольной. Место выхода жгутиков определяет *вентральную (брюшную)* сторону клетки.

Поперечная борозда у некоторых родов и видов имеет особую конфигурацию, и поэтому служит важным диагностическим признаком (рис. 50). Она может быть *медиальной (экваториальной)*, располагаясь примерно посередине клетки (рис. 50, в); *премедиальной*, то есть выше середины (рис. 50, б); *постмедиальной*, то есть ниже середины (рис. 50, г). Поперечная борозда, у которой дистальный конец смещается вниз по отношению к проксимальному концу, всегда находящемуся на левой стороне клетки, называется соответственно *левозавитой (смещение вниз)* (рис. 50, а, д, е) или *правозавитой (смещение вверх)*. Если дистальный и проксимальный концы сходятся, такая поперечная борозда считается *кольцевой* (рис. 50, в). При смещении дистальный конец может заходить на эпитеку (рис. 50, а) и образовывать *выступы* (рис. 50, д). *Спиральная* поперечная борозда делает несколько оборотов вокруг клетки (рис. 50, ж).

Клеточная оболочка динофлагеллят (тека, *амphiesма*) состоит из серии мембран, иногда с пелликулой и системой микротрубочек. Вторая

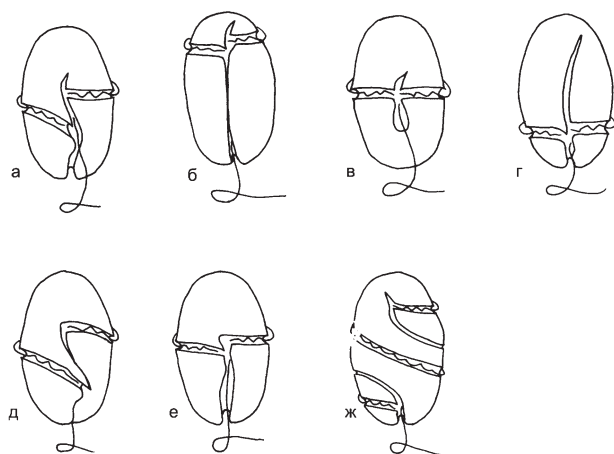


Рис. 50. Поперечные полосы динофлагеллят

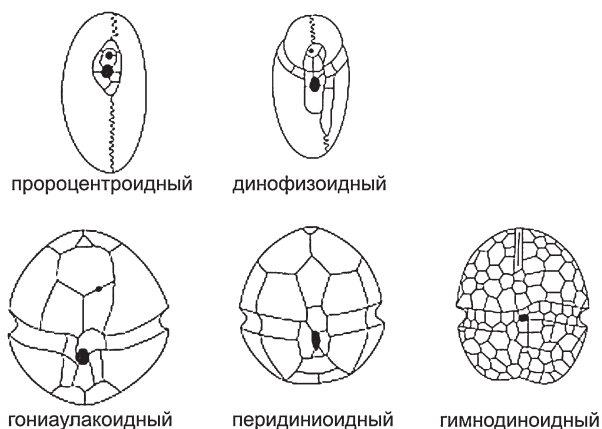


Рис. 51. Основные типы текальной организации динофлагеллят

и третья мембраны (от внешней к внутренней) обычно образуют текальные везикулы. Клетки динофлагеллят, у которых амphiesмальные везикулы пустые (или почти пустые) и которые выглядят «голыми», называются *беспанцирными* или *нетекатными*. Если текатные везикулы содержат полисахариды (целлюлоза, манноза, галактоза), образующие *текальные пластинки*, такие клетки называются *панцирными* или *текатными*. Основные типы текальной организации (*пророцентридный*, *динофизоидный*, *гониаулакоидный*, *перидиниоидный* и *гимнодиноидный*) представлены на рис. 51. Текатные пластинки панцирных клеток обычно тесно прилегают друг к другу, слегка перекрываясь, и формируют непрерывную поверхность. *Швы*, соединяющие пластинки панциря, представляют собой зону роста панциря. Роды и виды динофлагеллят отличаются по количеству, размерам и форме пластинок. Десмоконтные клетки покрыты двумя большими пластинками (*скорлупками*, *вальвами*). Рост клеток происходит по шву между пластинками. Вальва, наиболее изрезанная спереди околожгутиковыми пластинками, считается правой.

10. Экспресс-определитель родов динофлагеллят

В экспресс-определителе даны только роды водорослей, встречающиеся в фитопланктоне Белого моря. Если род представлен одним видом, указывается его видовое название. Экспресс-определитель составлен на основе «Identifying of marine phytoplankton» (1997). Однако следует иметь в виду, что применение современных методов исследования водорослей (электронная микроскопия, анализ ДНК и другие) приводит к ревизии таксонов. Поэтому для удобства работы с определителями мы сохранили таксономическую систему и названия родов и видов, предложенных «Identifying of marine phytoplankton», в скобках – синонимы из «Панцирных жгутиконосцев» [Киселев, 1950]. Современное название вида следует искать на сайте <http://www.algaebase.org>.

Изображения водорослей даны в основном в виде фотографий живых или фиксированных клеток в световом микроскопе, которые взяты из доступных сайтов в Интернете. Рисунки водорослей, фотографии которых отсутствуют в Интернете, взяты из «Панцирных жгутиконосцев».

1 (4) Водоросли не имеют панциря

2 (3) Поперечная борозда медиальная, трудно различимая. Продольная борозда есть только на эпитеке. Клетки веретеновидной формы. Имеется гибкое щупальце без цитоплазмы. Хлоропласты отсутствуют...

Pronostiluca acuta (рис. 52)



Рис. 52. *Pronostiluca acuta*. Длина клетки – 33 мкм

3 (2) Клетки с хорошо развитыми продольной и поперечной бороздами, динококонтные гимнодиниоидные. Хлоропласты имеются или отсутствуют: **порядок GYMNODINIALES**. В Белом море встречаются 6 родов:

– Поперечная борозда премедиальная со смещением или без смещения вниз. Эпитека меньше или равна 1/3 длины клетки. Клетки округлые, грушевидные, биконические; иногда сильно сжаты латерально или дорзовентрально. Выросты отсутствуют. Хлоропласты имеются...

Amphidinium (рис. 53)

– Поперечная борозда в виде влево завитой спирали с 1,5 или более оборотами. Клетки кажутся закрученными. Выросты отсутствуют. Иногда клетки формируют колонии в виде цепочки. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

Cochlodinium brandtii (рис. 54)



Рис. 53. *Amphidinium crassum*.
Длина клеток – 23 – 42 мкм, ширина – 11 – 24 мкм

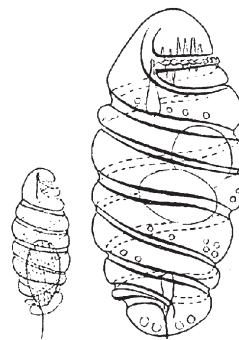


Рис. 54. *Cochlodinium brandtii*.
Длина клеток – 56 – 108 мкм, ширина – 47 мкм

– Поперечная борозда медиальная или премедиальная, кольцевидная или смещается вниз (не более чем на 1/5 длины тела). Продольная борозда часто заходит на эпитеку. Клетки сферические, биконические, лопастные, грушевидные. Некоторые виды с апикальным выростом. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

Gymnodinium (рис. 55)

– Поперечная борозда смещена вниз более чем на 1/5 (или даже на 1/3) длины клетки с выступом или без. Продольная борозда часто заходит на эпитеку. Клетки веретенообразные, биконические, яйцевидные, в виде слезы; иногда сильно сжаты латерально или дорзовентрально. Некоторые виды с апикальным выростом. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

Gyrodinium (рис. 56)



Рис. 55. *Gymnodinium fusus*.
Длина клеток – 54 – 65 мкм, ширина – 27 – 30 мкм

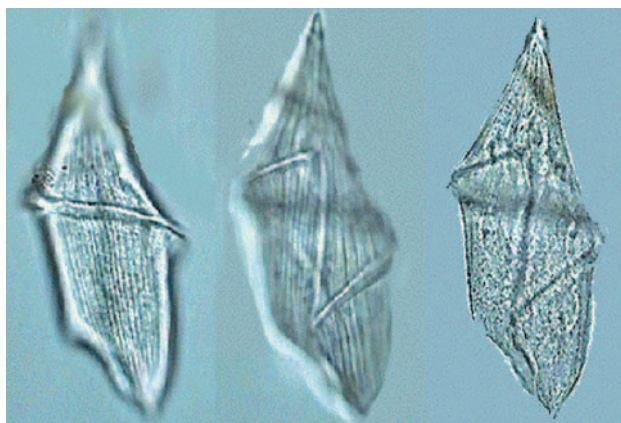


Рис. 56. *Gyrodinium spirale* с различных фокусов.
Длина клеток – 40 – 200 мкм, ширина – 20 – 45 мкм

– Поперечная борозда постмедиальная (слабо развита). Эпитека превышает гипотеку в два раза. Тека может быть ребристой. Внешняя мембрана покрыта характерными чешуйками. Клетки грушевидные, в виде перевернутого купола, булавы, гриба. Выросты отсутствуют. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

***Katodinium glaucum* (*Amphidinium extensum*)**
(рис. 57)

– Поперечная борозда с одним или двумя оборотами. Клетки кажутся закрученными. Имеется апикальный вырост. Хлоропласты отсутствуют

Warnowia schuetti

4 (1) Водоросли с панцирем.

5 (6) Нет ни поперечной, ни продольной борозды. Десмоконтные пророчентроидные клетки: **порядок PROROCENTRALES**. В Белом море встречается 1 род:

– Клетки сфероидные, грушевидные. Иногда на переднем конце имеется «зубец» или бугорок.



Рис. 57. *Katodinium glaucum*. А – клетка при различном увеличении; В – клетка, окрашенная раствором Люголя; С – клетки под различным фокусом, стрелка показывает истерченность панциря. Длина клеток – 36 – 62 мкм

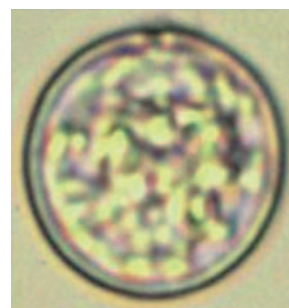


Рис. 58. *Prorocentrum balticum*. Диаметр клеток до 20 мкм

Поверхность валльв может иметь поры, ареолы и шипы. Хлоропласты имеются...

Prorocentrum (Exuviaella) (рис. 58)

6 (5) Поперечная и продольная борозда имеются.

7 (8) Диноконтные динофизоидные клетки, сплюснутые с боков. Поперечная борозда сильно смещена вперед (премедиальная) близко к апексу. Борозды часто с широкими крыльями (перепонками), подпертыми ребрами, крылья поперечной борозды в виде воронки: **порядок DINOPHYSIALES**. В Белом море встречается 1 род:

– Форма клетки напоминает «кружку» (гипотека) с «крышкой» (эпитека) и ручкой (высокое левое крыло продольной борозды). Иногда имеют выросты или бугорки на заднем конце. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

Dinophysis (частично *Phalacroma*) (рис. 59)



Рис. 59. *Dinophysis norvegica*. Длина клеток – 50 – 70 мкм, наибольшая ширина – 55 – 60 мкм

8 (7) Форма клеток иная

9 (10) Гониаулакоидный тип клеток с ассиметричной формой пластинок. Поперечная борозда смещена вниз: **порядок GONIAULACALES**. В Белом море встречается 7 родов:

– Поперечная борозда слегка смещена вниз. Клетки с 2 – 4 полыми рогами. Поверхность теки варьирует от гладкой с порами до сетчатой. Хлоропласты имеются...

Ceratium (рис. 60)

– Поперечная борозда медиальная, узкая, слегка смещена вниз. Клетки без выростов, биконические, в виде двояковыпуклой линзы. Иногда полярные оси отклонены. Продольная борозда короткая. Тека с порами и полосками. Хлоропласты имеются. Есть цисты...

Pyrophacus (рис. 61)

– Поперечная борозда со смещением вниз на 1 – 1,5 ширины пояска без выступа или искривления. Клетки сферические, полусферические, овальные, слегка биконические. Выросты отсутствуют. Поверхность теки включает поры, сетчатость, извилистость. Тека может быть от тонкой и хрупкой до складчатой. Хлоропласты имеются...

Alexandrium (частично *Goniodoma*, частично *Gonyaulax*) (рис. 62)

Peridiniella (частично *Gonyaulax*; частично *Glenodinium*) (рис. 63)

– Клетки с одним коническим апикальным рогом и, по крайней мере, с одним антапикальным шипом. Хлоропласты имеются

Amylax triacantha (Gonyaulax triacantha) (рис. 64)

– Поперечная борозда опускается до 6-кратной ширины пояска с выступом или без. Клетки



Рис. 60. *Ceratium fusus*.
Длина клеток – 200 – 540 мкм, ширина – 5 – 30 мкм

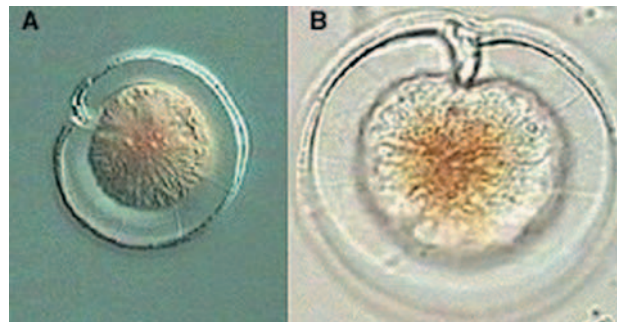


Рис. 61. *Pyrophacus horologium*.
Длина клеток – 32 – 125 мкм, ширина – 35 – 136 мкм

сферические, биконические, веретеновидные. У некоторых видов гиповальва с шипами. Теки варьируют по толщине и орнаменту. Хлоропласты имеются. Отмечены бентосные цисты...

Gonyaulax (частично *Protoperdinium*; частично *Protoceratium*) (рис. 65)

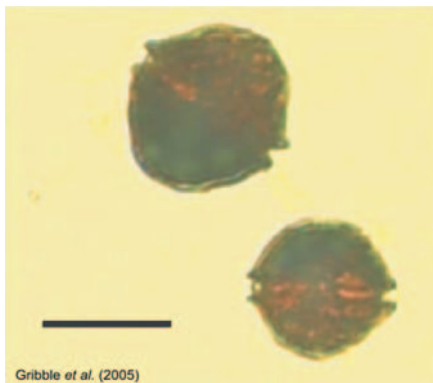


Рис. 62. *Alexandrium ostenfeldii*. Клетки в культуре. Масштаб – 20 мкм

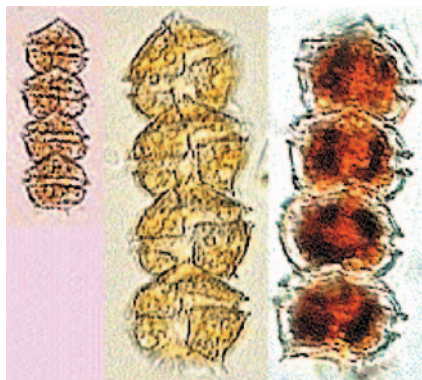


Рис. 63. *Peridiniella catenata*. Живые клетки и в растворе Люголя (справа). Длина клеток – 20 – 35 мкм, ширина – 20 – 35 мкм



Рис. 64. *Amylax triacantha*. Ширина клеток – 27 – 35 мкм

– Поперечная борозда премедиальная с небольшим смещением (0 – 0,5 ширины пояска). Клетки игловидные, грушевидные, эпитека значительно уже и меньше гипотеки. Хлоропласты имеются...

Oxytoxum (рис. 66)

10 (9) Перидиниоидный тип клеток: **порядок PERIDINIALES**. В Белом море встречается 5 родов:

– Тека с порами, полосками, сосочками, сетчатая. Клетки продуцируют известковые и, возможно, органические цисты. Некоторые виды имеют апикальные выросты...

Scripsiella trochoidea (*Peridinium trochoideum*) (рис. 67)

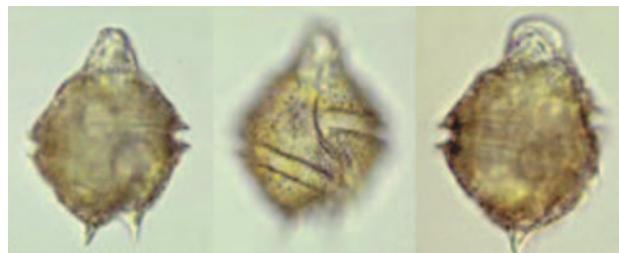
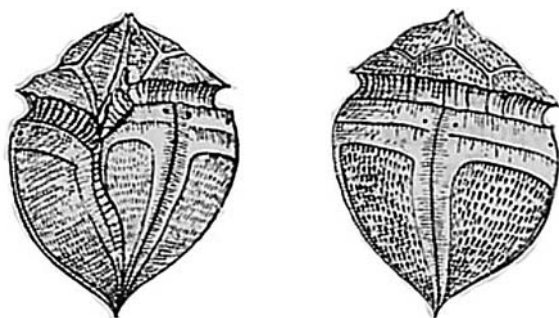


Рис. 65. *Gonyaulax spinifera*. Ширина клеток – 20 – 50 мкм



с брюшной стороны со спинной стороны

Рис. 66. *Oxytoxum belgicae*. Длина клеток – около 60 мкм



Рис. 67. *Scripsiella trochoidea*

– Клетки субсферические, в виде двояковыпуклой линзы, с выступающим левым крылом продольной борозды. Тека с рассеянными порами. Клетки продуцируют цисты. Хлоропласты отсутствуют...

***Diplopsalis lenticula* (*Glenodinium lenticula*)**
(рис. 68)

– Эпитека от округлой до конической. Гипотека от округлой до оттянутой в рог. Поперечная борозда слабо смещена и опущена. Клетки покрыты характерными чешуйкам. Хлоропласты имеются...

***Heterocapsa* (частично *Katodinium*, частично *Massartia*, частично *Peridinium*)** (рис. 69)

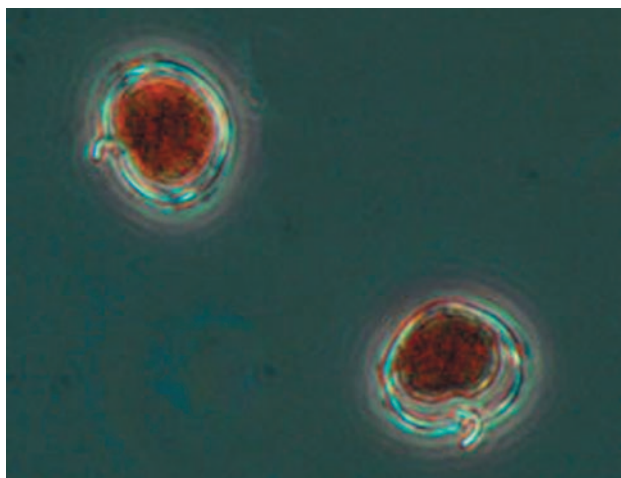


Рис. 68. *Diplopsalis lenticula*.
Длина клеток – 23 – 48 мкм, диаметр – 32 – 68 мкм

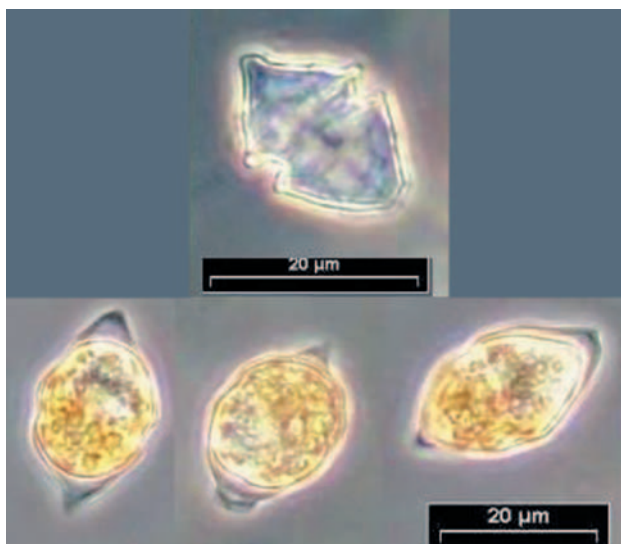


Рис. 69. *Heterocapsa triquetra*

– Клетки сферические, яйцеобразные, в виде двояковыпуклых линз. Поперечная борозда более медиальная...

Peridinium

– Форма клеток разнообразная. Поперечная борозда медиальная со смещением или без; смещение или вверх или вниз. Много видов с апикальными и антапикальными рогами или антапикальными шипами. Поверхностная орнаментация с пороидами, шипами и ареолами. Некоторые виды продуцируют характерные цисты. Хлоропласты имеются или отсутствуют...

***Protoperidinium* (частично *Peridinium*, частично *Glenodinium*)** (рис. 70)

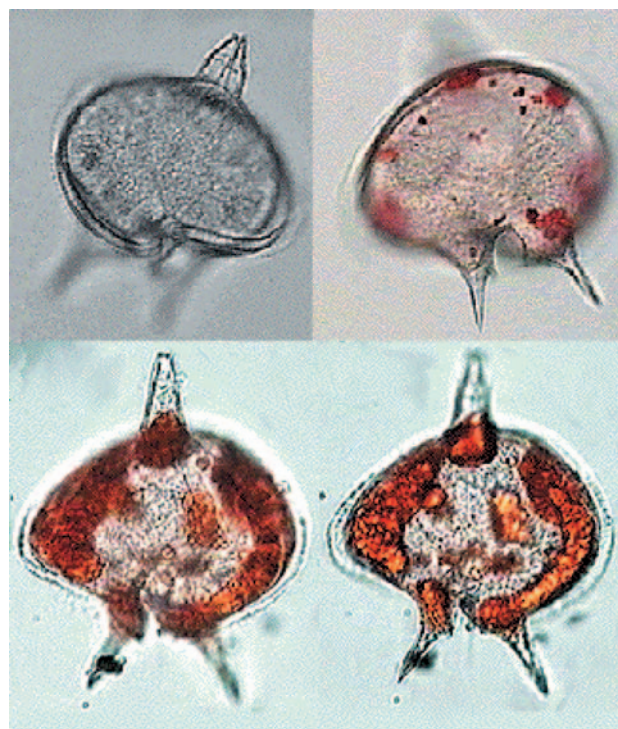


Рис. 70. *Protoperidinium depressum*.
Живые клетки с различного фокуса,
красные гранулы – запасной продукт.
Длина клеток – 116 – 200 мкм, ширина – 110 – 150 мкм

11. Оценка численности и биомассы фитопланктона

Традиционно обилие фитопланктона определяется численностью клеток путем их подсчета в аликвоте пробы. Однако при использовании численности фитопланктона для оценки его обилия возникает ряд вопросов, связанных с большими внутри- и межвидовыми различиями в размерах клеток. Виды с относительно низкой численностью, могут давать существенный вклад в биомассу фитопланктона. Поэтому обилие фитопланктона, основанное на определении численности, приводит к переоценке мелких, но многочисленных водорослей и к недооценке вкладов крупных водорослей. Более того, оценка численности водорослей ограничивает значение обилия фитопланктона при анализе пищевой цепи и пищевой ценности фитопланктона, когда требуется определение содержания углерода, азота и других субстратов в клетке. В таких случаях необходимо измерение биомассы фитопланктона. В то же время, измерение биомассы не оценивает концентрацию фитопланктона *sensu stricto*, а скорее обеспечивает измерение некоторой компоненты, общей для целой популяции, которая отражает численное обилие. Таким образом, измерение биомассы скорее дополняет, а не замещает оценку численности водорослей.

Оценка численности фитопланктона

Количественный учет организмов фитопланктона проводится различными способами. Сравнительное описание различных счетных камер и методов определения численности фитопланктона наиболее полно приведено в книге И. А. Киселева (1969): 1) счет сетного планктона, 2) камерный метод счета и 3) камерно-отстойный метод счета; и в «Phytoplankton manual» (1978): 1) методы счета с использованием стандартного микроскопа (в счетных камерах, на предметных стеклах и на мембранных фильтрах), 2) методы счета с использованием инвертированного и флуоресцентного микроскопов, 3) методы электронного счета и 4) метод разбавления культур.

Преимущества подсчета клеток под микроскопом над остальными способами состоят в том, что: (а) водоросли просматриваются, при этом возмож-

но обнаружить и оценить изменения во внешнем виде клеток, включая размер, формирование колонии, образование спор и заражение паразитами; (б) фиксируются и просчитываются водоросли, численность которых слишком низка для обнаружения с достаточной точностью опосредованными методами; (с) производится идентификация видов и определяется видовая структура сообщества. Кроме того, становятся возможными определение видовой сукцессии, оценка видовой разнообразия и других параметров фитопланктонного сообщества.

Наиболее удобной для подсчета клеток фитопланктона различной плотности и размерного состава с использованием стандартного светового микроскопа кафедрой гидробиологии Биологического факультета МГУ принята камера Нажотта. Технические данные и чертеж камеры приведены в книге В. Д. Федорова (1979), «Руководстве по методам биологического анализа морской воды и донных отложений» (1980). Камера располагается посередине предметного стекла. При высоте 0,05 см и площади 1 см² общий объем камеры равен 0,05 см³ (1/20 мл). Дно камеры для удобства счета разделено продольными черточками на 40 полос при ширине каждой полосы 250 мкм и длине 10 000 мкм (рис. 71). *Просчет особей в камере следует вести челноком*, последовательно исследуя содержимое полос и фиксируя каждую клетку.

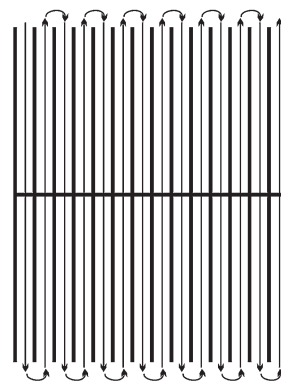


Рис. 71. Сетка, с помощью которой проводится подсчет клеток (стрелками указано направление просмотра «челноком»)

Каждую выборку следует просматривать при двух различных увеличениях – малом – для учета крупных форм фитопланктона, и большом – для просчета мелких водорослей. При учете численности каждой популяции в зависимости от ее плотности можно в пределах одной камеры анализировать разное число полос. Однако при сокращении числа анализируемых полос число анализируемых камер сокращать не следует. Если клетка лежит на черте, чтобы избежать повторного ее просчета, исследуя полосу справа и слева от нее, следует принять за правило: при исследовании полосы просчитывать только клетки, лежащие на полосе и на левой (или правой) черте.

При затянувшемся просмотре камеры, что часто происходит в начале работы, вода в ней испаряется. Чтобы не допустить пересыхания периодически необходимо добавлять каплю профильтрованной морской воды рядом с покровным стеклом, чтобы вода затекла под него. При прерывании счета камеру помещают в чашку Петри с небольшим количеством воды на дне, а для того чтобы камера не касалась воды, под нее ставят какой-либо устойчивый предмет.

Идеально, когда при анализе фитопланктона все живые на момент отбора пробы клетки обнаруживаются, подсчитываются и идентифицируются до вида. Мертвые клетки не просчитываются. Различить мертвые и живые клетки иногда довольно трудно. Исследователь может субъективно определить наличие хлорофилла, интенсивность пигментации, повреждение клетки и ее состояние. Различать живые и мертвые клетки позволяет специальное окрашивание.

Большинство пелагических видов диатомовых водорослей формируют цепочки плотно прикрепленных друг к другу клеток. Однако, поскольку клетка является основной воспроизводящей единицей, каждая клетка в колонии должна быть просчитана. В некоторых случаях требуется просчет колоний, например при анализе размерного распределения фитопланктона. Трихомы синезеленых водорослей, таких как *Trichodesmium*, часто собираются в пучки. Для таких видов, у которых подсчет отдельных клеток затруднен, просчитывается число колоний (трихомов).

Неопределенные виды также должны быть подсчитаны. Для этой цели их обозначают либо

«монады» или «флагелляты», либо дают подходящее описание, чтобы со временем дать более точное таксономическое название.

Оценка биомассы фитопланктона

Оценку биомассы фитопланктона можно производить по таким параметрам, которые связаны с биомассой (взвешенный органический углерод, хлорофилл, АТФ и др.). Однако подобные параметры сильно варьируют с изменением условий окружающей среды (освещение, доступность биогенных элементов и др.), а также не позволяют определить вклад отдельных таксономических групп водорослей и, следовательно, не могут быть использованы для сравнения роли различных видов в фитопланктонном сообществе. Всё более доступными становятся автоматическая или полуавтоматическая техника оценки объема водорослей, компьютерная томография отдельных клеток. Однако эти методы имеют ряд недостатков и продолжают совершенствоваться. Обзор современных методов по оценке объемов водорослей и соответствующие ссылки можно найти в статье Hillebrand et al. (1999).

Наиболее часто используется метод оценки биомассы микроводорослей по клеточному объему (биообъему). Объем вычисляется по линейным размерам клеток, измеряемым под микроскопом. Обычно для измерения биообъема исследователи делают схематические рисунки, определяют геометрическую фигуру, соответствующую данной водоросли, затем подставляют измеренные линейные размеры клетки в соответствующую геометрическую формулу, определяют объем и рассчитывают биомассу клетки. При оценке биомассы клеток сложной формы (например, видов рода *Ceratium*) исследователю приходится применять разные формулы для отдельных частей клетки и суммировать их. Применение определенных формул к клеткам водорослей, особенно сложной формы носит отчасти субъективный характер, что затрудняет сравнение данных разных авторов. Поэтому некоторые исследователи, пытаясь стандартизировать процедуру вычисления биообъемов, предлагают стандартный набор формул. Наиболее полный набор из 20 геометрических моделей с формулами объема и площади поверхности для более чем 850 пелагических и бентосных морских и пресноводных родов микроводорослей представлен в статье Hillebrand

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА

et al. (1999). Далее мы приводим эти модели вместе с формулами объемов (приложение: таблица 1). Применение этих формул для отдельных родов (только для встречающихся в Белом море) представлено в таблице 2 (приложение).

Основные правила, выполнение которых необходимо для получения наиболее достоверных значений биообъема:

1. При определении биообъема каждого вида достаточно измерить 20 – 25 особей, при этом стандартная ошибка составит 5 – 10 % [Hillebrand et al., 1999].

2. Средний биообъем вида определяется не по средним размерам клеток, а путем подсчета биообъема каждой особи, их суммирования и деления на количество измеренных особей [Phytoplankton manual, 1978, с. 274].

3. Измерения лучше проводить при самом большом увеличении, предпочтительно 400× – 1000× [Montagnes et al., 1994].

4. При работе с нанофитопланктоном, когда трехмерное измерение затруднено, третье измерение можно исключить и принять равными транс-апикальную и первальварную оси (ширина (*b*) и высота (*c*) в таблице 1) [Verity et al., 1992].

По вычисленному среднему объему клетки определяют среднюю сырую биомассу, принимая, что 1 мкм³ соответствует 1 пикограмму (10⁻¹² г). Однако в некоторых исследованиях, например при оценке фотосинтетической или гетеротрофной активности фитопланктона по скорости потребления меченого углерода, необходимо определять биомассу водорослей, выраженную в углеродных единицах. Было показано, что содержание углерода в клетке водорослей обратно пропорционально объему клетки, причем вид зависимости отличается у диатомей, динофлагеллят и других групп водорослей. Разными учеными были предложены формулы вычисления биомассы в углеродных единицах для различных групп водорослей. Наиболее используемыми являются уравнения [Menden-Deuer, Lessard, 2000]:

$$\begin{aligned} C &= 0,288 \cdot V^{0,811} && \text{диатомовые водоросли} \\ C &= 0,760 \cdot V^{0,819} && \text{динофлагелляты} \\ C &= 0,216 \cdot V^{0,939} && \text{остальной фитопланктон} \end{aligned}$$

Полученное значение *C* представляет собой количество углерода в клетке в пикограммах. Для дальнейших манипуляций удобнее сразу перевести значения *C* в микрограммы (1 мкг = 10⁻⁶ г).

Цель работы. Оценить численность и биомассу водорослей в фиксированных пробах фитопланктона Белого моря.

Оборудование и материалы:

1. Пробы фитопланктона Белого моря.
2. Микроскоп.
3. Камера Нажотта (0,05 мл).
4. Пипетка (0,05 или 0,1 мл).
5. Покровное стекло (24 мм × 24 мм).
6. Тряпочка для протирания стекол.
7. Чашка Петри.
8. Окулярмикрометр.
9. Объектмикрометр.
10. Альбом для рисования.
11. Тетрадь для ведения протокола.
12. Карандаш простой (лучше автоматический).
13. Калькулятор.
14. Определители.

Задача. Просчитать, одновременно с идентификацией видов, количество клеток фитопланктона в камере Нажотта, заполняя ее 3 раза. Рассчитать численность клеток в 1 литре для каждого вида в отдельности и для всего сообщества фитопланктона. Рассчитать сырую биомассу и биомассу, выраженную в углеродных единицах, для каждого вида водорослей в отдельности и для всего фитопланктонного сообщества в 1 литре.

Процедура

1. Флакончик со сконцентрированной пробой фитопланктона тщательно взболтать, пипеткой отобрать из пробы 3 – 4 капли, заполнить счетную камеру, аккуратно накрывая покровным стеклом, чтобы в камере не оставил пузырьков воздуха. Затем под микроскопом просчитать все клетки водорослей, находящиеся в 40 полосках камеры, параллельно идентифицируя и зарисовывая их. Оптимально на каждой полосе камеры должно располагаться 15 – 30 особей. Камеру помыть, просушить салфеточкой и таким же образом снова заполнить и просчитать клетки, не забывая взбалтывать перед этим флакончик с пробой. Процедуру повторить еще 1 раз (всего 3 раза). Результаты счета занести в рабочий протокол (приложение: таблица 3), при этом число встреченных особей вида удобно отмечать в виде точек и соединяющих их черточек, которые в конечном счете образуют

квадрат с двумя диагоналями, соответствующий числу 10. При дальнейшем увеличении числа особей рисуется новый квадрат и т. д. При больших численностях подсчет квадратов, т. е. десятков, значительно облегчает работу.

2. Каждый вид водорослей зарисовать и найти для него соответствующую геометрическую фигуру (приложение: таблицы 1, 2). Рядом с рисунком начертить таблицу, в которую следует внести все измерения и вычисления (в качестве примера предложена таблица 4 (приложение). Уточнив, какие измерения необходимо провести, определить линейные размеры у 20 – 25 клеток каждого вида или всех клеток, если особей вида в трех камерах меньше 20. Вычислить для каждого вида средний объем (V).

3. Оформить контрольный протокол, производя необходимые вычисления и заполняя таблицу 5 (приложение).

Для пересчета количества клеток на 1 л составляются математические пропорции.

В камере Нажотта

$$0,05 \text{ мл} \rightarrow n \text{ клеток.}$$

В 1 л,

при концентрировании объема V л до

$$v \text{ мл} \rightarrow N \text{ клеток.}$$

Следовательно,

$$N (\text{кл} / \text{л}) = \frac{n (\text{кл}) \cdot v (\text{мл})}{0,05 (\text{мл}) \cdot V (\text{л})} = \frac{20nv}{V}$$

12. Анализ полученных результатов

На основании полученных результатов можно сделать вывод о структуре фитопланктона в районе отбора проб в определенный период времени, а также определить влияние различных экологических факторов на ее динамику.

Анализ структуры фитопланктона в каждой отобранной пробе с определенного горизонта или станции включает в себя следующие этапы:

1. Отмечается число встреченных видов.

2. Все виды распределяются по соответствующим отделам и/или классам. Далее определяют число видов в каждом отделе (классе) и ранжируют отделы (классы) по количеству видов.

3. В качестве дополнительной информации можно выделить *виды с известной фитогеографической характеристикой*: космополиты, аркто-бореальные, бореальные, тропические и др.; и *виды с приоритетным местообитанием*: океанические, неритические, панталассные и др. [Ильяш и др., 2003].

4. Вычисляется доля каждого вида в суммарной численности (N) и суммарной биомассе (B) делением численности или биомассы вида на N или B соответственно.

5. Определяется доминирующий по численности вид, если его доля в суммарной численности больше 60 %; массовые виды, если их доля составляет 30 – 60 %.

6. Определяется доминирующий по биомассе вид, если его доля в суммарной биомассе больше

60 %; массовые виды, если их доля составляет 30 – 60 %.

7. Сравняется структура фитопланктона в анализируемых пробах в рамках экологической задачи и выявляется влияние выбранных факторов среды.

Полученные результаты оформляются в письменном виде следующим образом:

Результаты

В ходе исследования обнаружено ___ видов водорослей, ___ из которых не идентифицированы. Остальные ___ видов относятся к ___ отделам. В основном планктон представлен (например) динофитовыми (___ видов) и охрофитовыми (класс диатомовые, золотистые) (___ вида). Из других групп водорослей присутствовали (например) примнезиофитовые (___ вида) и т. д. Среди видов с известной фитогеографической характеристикой (___ вида) космополитов – __%, аркто-бореальных – __%, аркто-бореально-тропических – __% и т. д. Среди видов с известным приоритетным местообитанием (___ вида) неритических – __%, океанических – __%, панталассных – __%, солоноватоводных – __%, пресноводных – __% и др.

Наименьшее число видов обнаружено на станции ___ (___ видов), наибольшее – на станции ___ (___ вида).

Наибольшая суммарная численность водорослей отмечена на станции ____, наименьшая – на станции ____. Доминировали по численности (был/были массовыми) на станции ____, вид _____, составляя ____% от суммарной численности, на станции ____, вид _____, составляя ____% от суммарной численности.

Наибольшая суммарная биомасса водорослей отмечена на станции ____, наименьшая – на станции ____. Доминировали по биомассе (был/были

массовыми) на станции ____, вид _____, составляя ____% от суммарной биомассы, на станции ____, вид _____, составляя ____% от суммарной биомассы.

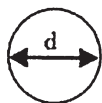
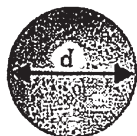
Выводы: отметить наличие или отсутствие достоверных изменений в структуре фитопланктона, что может свидетельствовать о влиянии тех или иных экологических факторов на структуру фитопланктона.

Приложение

Таблица 1

Геометрические фигуры и уравнения для вычисления биообъемов [Hillebrand et al., 1999]. Фигуры представлены в трехмерном виде и в поперечных сечениях. В уравнениях используются стандартные обозначения линейных размеров. Обозначения: V – объем; r – радиус; d – диаметр; h – высота; a – апикальная ось (длина); b – трансапикальная ось (ширина); c – первальварная ось (высота); z – высота конуса; l – длина одной стороны; m – высота треугольника

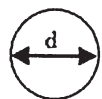
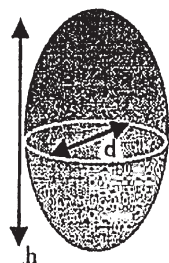
сфера



поперечное сечение

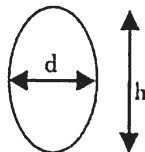
$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{\pi}{6}d^3$$

удлиненный сфероид



поперечное сечение

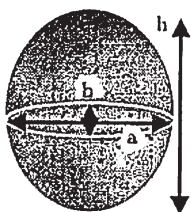
Субсферическое тело с круглым поперечным сечением и эллиптическим апикальным сечением



апикальное сечение

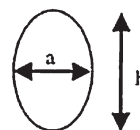
$$V = \frac{\pi}{6}d^2h$$

эллипсоид



поперечное сечение

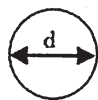
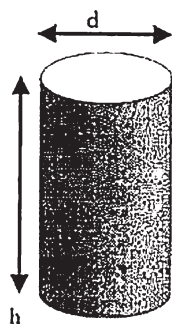
Тело субсферическое с тремя различными измерениями (удлиненный сфероид с эллиптическим поперечным сечением)



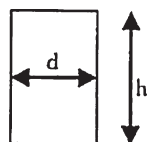
апикальное сечение

$$V = \frac{\pi}{6}abh$$

цилиндр



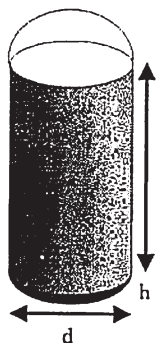
поперечное сечение



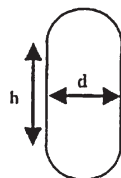
апикальное сечение

$$V = \frac{\pi}{4} d^2 h$$

цилиндр+2 полусферы



поперечное сечение

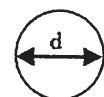
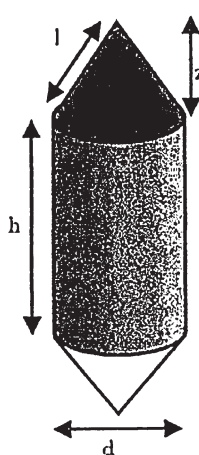


апикальное сечение

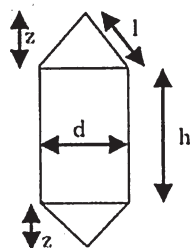
Фигура приписывается в основном цилиндрическим диатомеям с куполообразными вальвами (*Stephanopyxis*)

$$V = \frac{1}{4} \pi d^2 h + \frac{1}{6} \pi d^3 = \pi d^2 \left(\frac{h}{4} + \frac{d}{6} \right)$$

цилиндр+2конуса



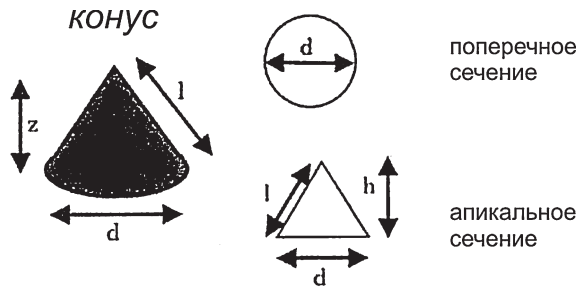
поперечное сечение



апикальное сечение

Подобно предыдущей форме эта форма приписывается цилиндрическим видам, но здесь клетки имеют остроконечные апексы

$$V = \frac{\pi}{4} d^2 h + 2 \frac{\pi}{12} d^2 z = \pi d^2 \left(\frac{h}{4} + \frac{z}{6} \right)$$

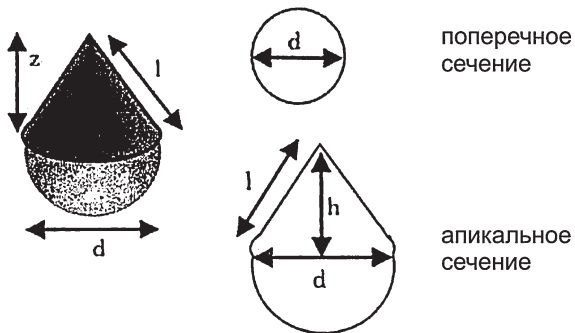


$$V = \frac{1}{3} \pi r^2 z = \frac{\pi}{12} d^2 z$$

Для усеченного конуса можно использовать следующее уравнение (d_1, d_2 – диаметры оснований):

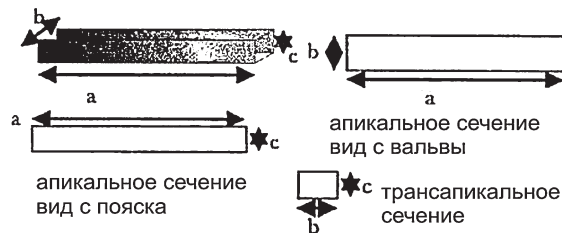
$$V = \frac{\pi}{12} z (d_1^2 + d_1 d_2 + d_2^2)$$

конус+полусфера



$$V = \frac{1}{3} \pi r^2 z + \frac{1}{2} \cdot \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{\pi}{12} d^2 (z + d)$$

прямоугольная коробочка

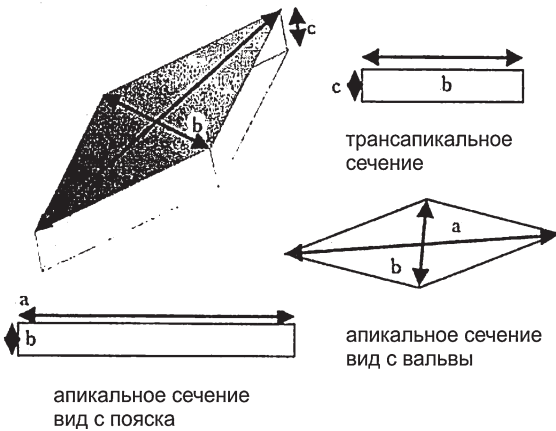


$$V = abc$$

Куб – вариант данной формы, где $a = b = c$, следовательно:

$$V = a^3$$

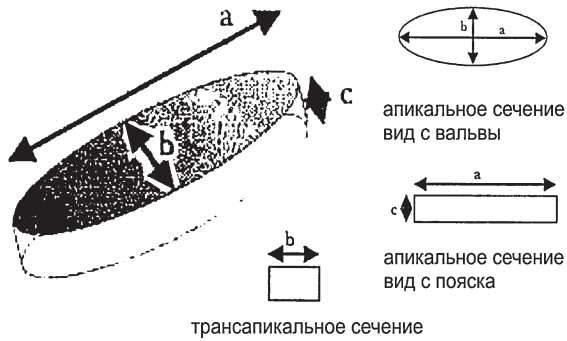
призма на основе параллелограмма



Ромбические виды диатомей принадлежат, например, к родам *Pleorosigma* и *Gyrosigma*, базисный параллелограмм имеет равные стороны

$$V = \frac{1}{2} abc$$

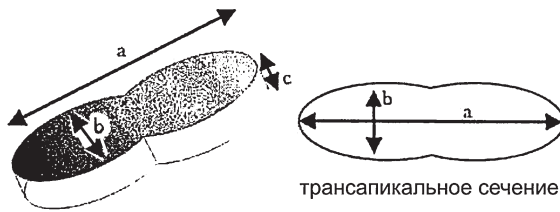
эллиптическая призма



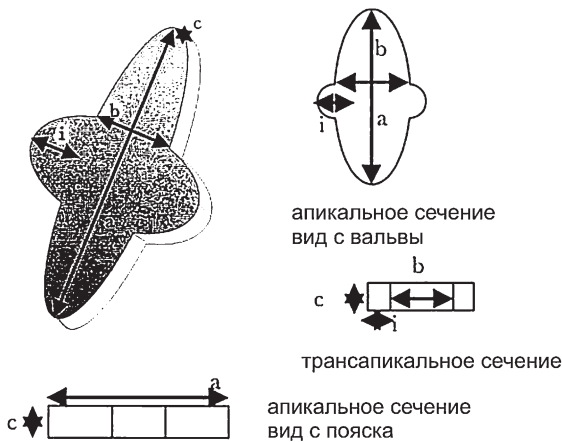
Эта форма применима для эллиптических пennaтных диатомей, даже если они с перетяжкой со стороны вальвы, в последнем случае берется среднее значение между центральной и максимальной шириной

$$V = \frac{\pi}{4} abc$$

эллиптическая призма с трансапикальной перетяжкой



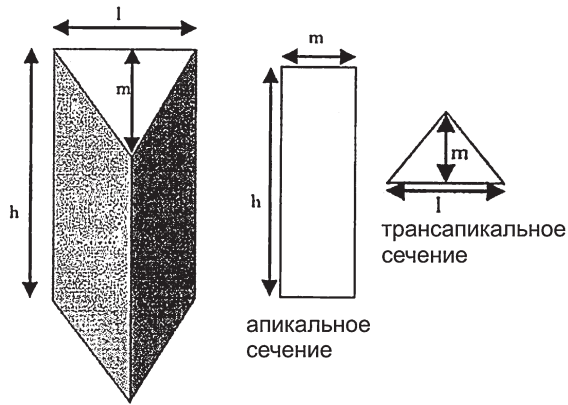
эллиптическая призма с трансапикальным вздутием



Некоторые пennaтные диатомовые и эвгленовые водоросли, например *Tetraceclus* и некоторые *Euglena sp.* имеют латеральные вздутия. Эти вздутия, два полукруглых цилиндра (т. е. один цилиндр), могут быть добавлены к объему центральных эллиптических цилиндров

$$V = \frac{1}{4} \pi abc + \frac{1}{4} \pi ci = \frac{\pi}{4} c(ab + i^2)$$

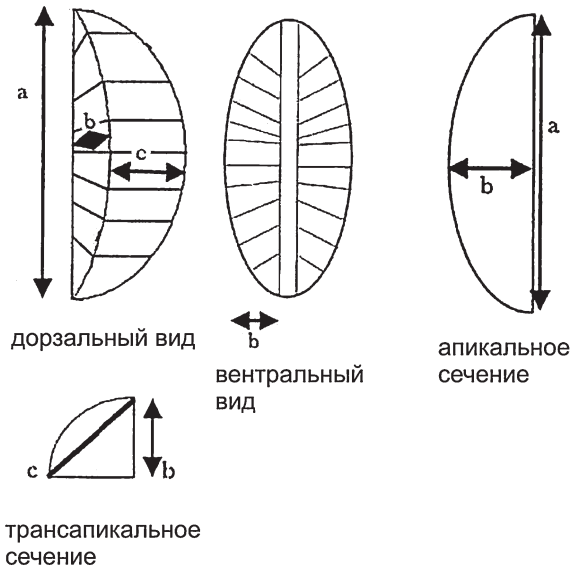
Призма на треугольной основе



Диатомеи такой формы относятся к центрическим диатомовым водорослям. В большинстве случаев треугольник основы равносторонний

$$V = \frac{1}{2}lmh$$

цимбеллоид

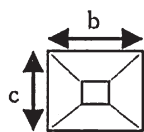
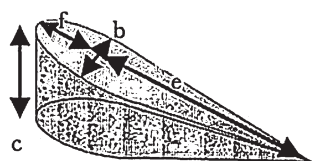


Названное по диатомовому роду *Cymbella*, тело имеет форму лимонной дольки. Объем вычисляется как объем сектора удлиненного сфероида. Этот эллипсоид является вращательным с трансапикальной осью в качестве радиуса и апикальной – в качестве самого большого диаметра эллипса, c – первальварная ось на дорзальной стороне, β – угол между двумя трансапикальными сторонами, вычисляется следующим образом:

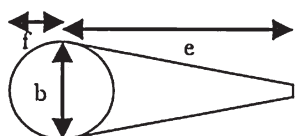
$$\sin \frac{\beta}{2} = \frac{c}{2b}$$

$$V = \frac{1}{6} \pi (2b)^2 a \frac{\beta}{360} = \frac{4}{6} \pi b^2 a \frac{\beta}{360}$$

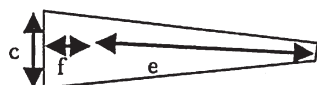
гомфонемиод



трансапикальный вид со стороны полюса основания (ножного полюса)



апикальное сечение вид с вальвы



апикальное сечение вид с пояска

Названная по роду пеннатных диатомовых *Gomphonema*, эта форма наиболее сложная из-за двойной биполярности: два полюса апикальной оси разной ширины и высоты. Очень простое приближение, но не совсем точное – усеченная пирамида. Более реальная модель – тороид с булавовидным поперечным сечением: e – длина от самой широкой трансапикальной части до ножного полюса, b – максимальная трансапикальная ширина, c – максимальная первальварная высота (головной полюс), f – длина от самой широкой трансапикальной части до головного полюса

$$V = bc \left(\left[\frac{\pi \cdot e}{4} \right] + \left[\frac{f - 1}{3} \right] \right)$$

Применение геометрических формул для вычисления биообъемов микроводорослей [Hillebrand et al., 1999], которые встречаются в планктоне Белого моря [Ильяш и др., 2003]. Возможны отклонения в фигурах внутри родов, поэтому допустима корректировка формулы для отдельных видов

Род	Форма
Chrysophyceae	
<i>Dinobryon</i>	Удлиненный сфероид Исключение: <i>D. balticum</i> : цилиндр Поперечное сечение может быть скорее эллиптическим, чем круглым. В этом случае в уравнении квадрат диаметра следует заменить произведением меньшего диаметра на больший диаметр.
Dictyochophyceae	
<i>Dictyocha</i>	Сфера
<i>Parapedinella</i>	Сфера
Bacillariophyceae	
<i>Achnanthes</i>	Эллиптическая призма У видов, коленчато-согнутых с пояса, апикальную ось можно измерить более точно, если суммировать длину двух прямых частей. У видов с ромбической вальвой биообъем вычисляется как призма на основе параллелограмма. У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка. Некоторые виды имеют сильно головчатые полюса, которые добавляются как цилиндры. В этом случае апикальная ось равна апикальной длине без головчатых концов.
<i>Actinocyclus</i>	Цилиндр
<i>Actinoptychus</i>	Цилиндр
<i>Amphiprora</i>	Эллиптическая призма
<i>Amphopra</i>	Цимбеллоид Некоторые виды (<i>Amphora decussata</i> , <i>A. commutata</i> , <i>A. ostrearia</i>) по форме больше напоминают полуэллиптические цилиндры, нежели лимонные дольки из-за глубокого пояса. Следовательно их биообъемы должны вычисляться как полуэллиптические цилиндры.
<i>Asterionella</i>	Коробочка + 2 цилиндра
<i>Asterionellopsis</i>	Призма на треугольной основе
<i>Asteromphalus</i>	Цилиндр Высота измеряется как среднее между минимальным и максимальным значениями.
<i>Atteya</i>	Эллиптическая призма
<i>Bacillaria</i>	Коробочка
<i>Bacterosira</i>	Цилиндр

Род	Форма
<i>Cerataulina</i>	Цилиндр
<i>Cerataulus</i>	Эллиптическая призма
<i>Chaetoceros</i>	Эллиптическая призма Крупные щетинки должны быть добавлены отдельно как конусы или цилиндры. Некоторые виды округлые со стороны вальвы и могут вычисляться как цилиндры.
<i>Coscinodiscus</i>	Цилиндр
<i>Ctenophora</i>	Эллиптическая призма У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка.
<i>Cyclotella</i>	Цилиндр
<i>Cylindrotheca</i>	Удлиненный сфероид + 2 цилиндра Веретеновидная центральная часть и клювовидные концы считаются отдельно.
<i>Dactyliosolen</i>	Цилиндр
<i>Detonula</i>	Цилиндр
<i>Ditylum</i>	Призма на треугольной основе
<i>Entomoneis</i>	Эллиптическая призма Высота измеряется как среднее между минимальным и максимальным значением.
<i>Eucampia</i>	Эллиптическая призма Высота измеряется как среднее между минимальным и максимальным значением.
<i>Fallacia</i>	Эллиптическая призма
<i>Fragilaria</i>	Эллиптическая призма У видов с ромбической вальвой биообъем вычисляется как призма на основе параллелограмма. У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка. Для некоторых видов с выпуклой центральной частью см. эллиптическую призму с трансапикальным вздутием.
<i>Fragilariopsis</i>	Эллиптическая призма
<i>Gomphonema</i>	Гомфонемоид Меньшая часть с головным полюсом вычисляется как квадрат, а выпуклый ножной полюс – как неэллиптический цилиндр.
<i>Gomphonemopsis</i>	Гомфонемоид
<i>Grammatophora</i>	Эллиптическая призма У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка.
<i>Guinardia</i>	Цилиндр
<i>Gyrosigma</i>	Призма на основе параллелограмма
<i>Hemiaulus</i>	Эллиптическая призма

Род	Форма
<i>Lauderia</i>	Цилиндр
<i>Leptocylindrus</i>	Цилиндр
<i>Melosira</i>	Цилиндр <i>Melosira nummuloides</i> очень изменчива по форме. Чаще она напоминает цилиндр с двумя полусферами или сферу.
<i>Navicula</i>	Эллиптическая призма У видов с ромбической вальвой биообъем вычисляется как призма на основе параллелограмма. У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка.
<i>Nitzschia</i>	Призма на основе параллелограмма Род <i>Nitzschia</i> изменчив по форме. Сигмоидные или ромбические клетки могут вычисляться как призма на основе параллелограмма. Эллиптические виды вычисляются как эллиптическая призма, линейные виды – как коробочки.
<i>Odontella</i>	Эллиптическая призма Крупные щетинки должны быть добавлены отдельно как конусы или цилиндры.
<i>Plagiogramma</i>	Эллиптическая призма
<i>Pleurosigma</i>	Призма на основе параллелограмма
<i>Porosira</i>	Цилиндр
<i>Proboscia</i>	Цилиндр
<i>Pseudonitzschia</i>	Призма на основе параллелограмма У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка.
<i>Rhizosolenia</i>	Цилиндр
<i>Skeletonema</i>	Цилиндр + 2 полусферы Виды с плоской вальвой могут рассматриваться как цилиндры.
<i>Stauroneis</i>	Эллиптическая призма У видов с линейной вальвой биообъем вычисляется как коробочка.
<i>Synedra</i>	Коробочка Виды с эллиптической вальвой вычисляются как эллиптическая призма.
<i>Tabellaria</i>	Эллиптическая призма Следует иметь в виду, что диаметр клеток разный в пределах одной цепочки.
<i>Thalassionema</i>	Коробочка
<i>Thalassiosira</i>	Цилиндр
<i>Trachyneis</i>	Эллиптическая призма

Род	Форма
Prymnesiophyceae	
<i>Chrysochromulina</i>	Удлиненный сфероид Поперечное сечение может быть скорее эллиптическим, чем круглым. В этом случае в уравнении квадрат диаметра следует заменить произведением меньшего диаметра на больший диаметр. Некоторые клетки или виды имеют удлиненную форму, объем которой следует вычислять как объем цилиндра или удлиненного сфероида.
<i>Emiliana</i>	Цилиндр
<i>Phaeocystis</i>	Сфера
Cryptophyceae	
<i>Chroomonas</i>	Конус + полусфера
<i>Hillea</i>	Удлиненный сфероид
<i>Leucocryptos</i>	Конус + полусфера
<i>Teleaulax</i>	Конус + полусфера
Dinophyceae	
<i>Alexandrium</i>	Эллипсоид
<i>Amphidinium</i>	Эллипсоид Исключения: <i>A. sphaenoides</i> : удлиненный сфероид.
<i>Amylax</i>	Конус + полусфера
<i>Ceratium</i>	Эллипсоид + 2 конуса + цилиндр Поперечное сечение может быть скорее эллиптическим, чем круглым. В этом случае в уравнении квадрат диаметра следует заменить произведением меньшего диаметра на больший диаметр. Род <i>Ceratium</i> довольно вариабелен по форме. Основная задача состоит в вычислении центрального тела клетки, затем добавить гипотекальные рога как конусы и апикальный рог как цилиндр. Исключения: <i>C. arcticum</i> , <i>C. tripos</i> : центральное тело вычисляется как конус; <i>C. gravidum</i> : эллипсоид с двумя конусами; <i>C. fusus</i> : 2 конуса.
<i>Cochlodinium</i>	Удлиненный сфероид
<i>Dinophysis</i>	Эллипсоид
<i>Diplopsalis</i>	Конус + полусфера
<i>Diplopsalopsis</i>	Сфера
<i>Glenodinium</i>	Эллипсоид
<i>Gonyaulax</i>	2 конуса Исключения: <i>G. grindleyi</i> : эллипсоид; <i>G. spinifera</i> : конус + полусфера
<i>Gymnodinium</i>	Эллипсоид

Род	Форма
<i>Gyrodinium</i>	Эллипсоид Исключения: <i>G. lachryma</i> : конус + полусфера.
<i>Heterocapsa</i>	2 конуса
<i>Katodinium</i>	Цилиндр + конус
<i>Oblea</i>	Сфера
<i>Oxytoxum</i>	Удлиненный сфероид
<i>Peridiniella</i>	Эллипсоид
<i>Peridinium</i>	Эллипсоид
<i>Pronoctiluca</i>	Конус + полусфера
<i>Prorocentrum</i>	Эллипсоид
<i>Protoperidinium</i>	2 конуса
<i>Pyrophacus</i>	Эллипсоид
<i>Scrippsiella</i>	Эллипсоид
<i>Warnowia</i>	Удлиненный сфероид
Euglenophyceae	
<i>Eutreptiella</i>	Цилиндр + конус
Prasinophyceae	
<i>Halosphaera</i>	Сфера
<i>Pterosperma</i>	Сфера
<i>Pyramimonas</i>	Конус

Таблица 3

Рабочий протокол обработки проб фитопланктона

№	Вид	Численность клеток			
		в камере			средняя в камере, n
		1	2	3	
1					
2					
...					

Таблица 4

Схема оформления таблицы для определения биообъемов клеток отдельных видов

№ клетки	a (d , ...), мкм	b (h , ...), мкм	c (z , ...), мкм	Формула	V , мкм ³
1					
2					
...					
25					
Среднее значение					

Таблица 5

Контрольный протокол обработки проб фитопланктона

№	Вид	Объем клетки, V (мкм ³)	Биомасса клетки		Численность клеток в литре, N (кл/л)	Биомасса клеток в литре	
			«углеродная» (мкг С)	сырая, мкг		сырая, B (мкг/л)	«углеродная», C (мкг С/л)
1							
2							
...							
Итого для всего сообщества							

Ссылки на источники изображений водорослей

- Рис. 9. http://biology.missouristate.edu/phycoology/asian%20carp/asian_carp_in_the_missouri_river.htm
- Рис. 10. <http://www.io-arnemuende.de/research/images/bacillariophyceae/porosiragla.jpg>
- Рис. 11. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/coscinodiscus_concinnus.htm
- Рис. 12. <http://www.io-warnemuende.de/research/images/bacillariophyceae/actioct.jpg>
- Рис. 13. <http://www.io-warnemuende.de/research/images/bacillariophyceae/thalnordenskioldii.jpg>
- Рис. 14. http://www.nodc.noaa.gov/OC5/BARPLANK/WWW/PHOTO/t_nail/bac-fr-t.jpg
- Рис. 15. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/detonula_confervacea.gif
- Рис. 16. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/lauderia_annulata.gif
- Рис. 17. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/skeletonema_costatum.gif
- Рис. 18. <http://www.io-warnemuende.de/research/images/bacillariophyceae/melosiramon.jpg>
- Рис. 19. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/leptocylindrus_minimus.gif
- Рис. 21. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/rhizosolenia_setigera.gif
- Рис. 22. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/proboscia_alata.gif
- Рис. 23. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/guinardia_delicatula.gif
- Рис. 24. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/dactyliosolen_fragilissimus.gif
- Рис. 26. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/cerataulina_pelagica.gif
- Рис. 27. <http://www.ifremer.fr/envlit/actualite/img/200401226Sinensisdetail.jpg>
- Рис. 28. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/eucampia_groenlandica.gif
- Рис. 29. http://www.nodc.noaa.gov/OC5/BARPLANK/WWW/PHOTO/SMALL/chaco_i_s.jpg
- Рис. 30. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/chaetoceros_curvisetus.gif
- Рис. 31. http://www.io-warnemuende.de/research/images/bacillariophyceae/attheya_septentrionales.jpg
- Рис. 32. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/ditylum_brightwellii.gif
- Рис. 33. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/odontella_aurita.gif
- Рис. 34. http://www.nodc.noaa.gov/OC5/BARPLANK/WWW/PHOTO/SMALL/pleani_s.jpg
- Рис. 35. <http://forum.mikroskopia.com/uploads/post-17-1157139634.jpg>
- Рис. 36. <http://www.lanuv.nrw.de/wasser/gifs/entomoneis-paludosa.png>
- Рис. 37. http://www.dnr.state.md.us/bay/cblife/algae/diatom/cylindrotheca_closterium_book.jpg
- Рис. 38. http://www.polar.se/english/expeditions/ao2002/bilder/images/0504_Nitzschia_frigida_colony.jpg
- Рис. 39. <http://www.murman.ru/barentsphyto/photo/nav-van.jpg>
- Рис. 40. <http://aslo.org/photopost/data/516/14Synedra.jpg>
- Рис. 41. <http://cimt.ucsc.edu/images/HAB%20ID/diatom/Asterionellopsis-glacialis.jpg>
- Рис. 42. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/diatoms/thalassionema_nitzschoid.gif
- Рис. 43. http://www.fimr.fi/en/tietoa/algaline_seuranta/lajistoraportit/lajistoraporttiarkisto/2003/en_GB/879/_files/12076504320062-183/default/Achnanthes_taeiniata__1b40_fp00942003.jpg
- Рис. 44. http://www.serc.si.edu/labs/phytoplankton/guide/addtl_collections/Belize%20/Images/Nitzschia-paradoxa-Bel2.jpg
- Рис. 45. <http://blacksea.orlyonok.ru/images/5/16.jpg>
- Рис. 46. http://photography.si.edu/upload/Images/sm_1345_Image_Fragilariopsis-kerquelensis.jpg
- Рис. 47. [Диатомовый анализ, 1950]
- Рис. 48. http://www.dnr.state.md.us/bay/cblife/algae/diatom/pseudonitzschia_seriate_large.jpg
- Рис. 52. [Киселев, 1950]
- Рис. 53. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/amphidinium_crassum.gif
- Рис. 54. [Киселев, 1950]
- Рис. 55. <http://www.lefo.ro/iwlearn/vali/Gymnodinium%20vestificii.jpg>
- Рис. 56. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/gyrodinium_spirale.gif
- Рис. 57. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/katodinium_glaucum.gif
- Рис. 58. <http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/Small/plankton/Prorocentrum-1-s.jpg>
- Рис. 59. http://www.fimr.fi/dokumentitjarjestelma/kuvagalleria/7/fi_FI/42/_files/12076504320049675/default/42.jpg
- Рис. 60. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/ceratium_fusus.gif

- Рис. 61. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/pyrophacus_horologium.gif
 Рис. 62. http://www.liv.ac.uk/hab/Data%20sheets/a_oste/fig6.htm
 Рис. 63. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/peridiniella_catenata.gif
 Рис. 64. http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/plankton/figure/Amylax_triactantha.jpg
 Рис. 65. http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/plankton/figure/Gonyaulax/Gonyaulax_spinifera.jpg
 Рис. 66. [Киселев, 1950]
 Рис. 67. http://www.sahfos.ac.uk/pil/scrippsiella_spp.jpg
 Рис. 68. <http://www.serc.si.edu/labs/phytoplankton/guide/dinoflagellates/images/Diplopsalis-lenticula.jpg>
 Рис. 69. <http://www.io-warnemuende.de/research/images/dinophyceae/hetetri1.jpg>
 Рис. 70. http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/dinoflagellates/protoperidinium_depressum.gif

Список литературы

- Бабков А. И., Голиков А. Н.* Гидробиокомплексы Белого моря. – Л.: ЗИН АН, 1984. 104 с.
- Гогорев Р. М., Макарова И. В.* Род Chaetoceros (Bacillariophyta) в Белом море // Ботан. журн. 1999. Т. 84. № 5. С. 31 – 39.
- Диатомовый анализ. Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Книга 2 / Под общ. ред. *А. Н. Криштофовича*. – Л.: Геолиздат, 1949. 342 с.
- Диатомовый анализ. Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей. Книга 3 / Под общ. ред. *А. Н. Криштофовича*. – Л.: Геолиздат, 1950. 508 с.
- Ильяш Л. В., Житина Л. С., Федоров В. Д.* Фитопланктон Белого моря. – М.: Янус-К, 2003. – 168 с.
- Ильяш Л. В., Радченко И. Г., Кузнецов Л. Л., Лисицын А. П., Мартынова Д. М., Новигатский А. Н., Чульцова А. Л.* Пространственная вариабельность фитопланктона Белого моря и его продукционных характеристик во второй половине августа // Океанология, 2010, в печати.
- Киселев И. А.* Панцирные жгутиконосцы (Dinoflagellata) морей и пресных вод СССР. – М.; Л.: Наука, 1950. 280 с.
- Киселев И. А.* Планктон морей и континентальных водоемов. Л.: Наука, 1969. Т. 1. 657 с.
- Конопля Л. А.* Вертикальное распределение фитопланктона Карельского побережья Белого моря// Океанология. 1973. Т. 13. № 2. С. 314 – 320.
- Макарова И. В.* Диатомовые водоросли СССР: Род Thalassiosira Cl. // Диатомовые водоросли морей СССР. – М.: Наука, 1988. Т. 2. Вып. 1. С.56 – 58.
- Водоросли. Справочник / *Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П.* и др. – Киев: Наук. думка, 1989. 608 с.
- Определитель низших растений. Водоросли / Под общ. ред. *Л. И. Курсанова*. – М.: Советская наука, 1953. Т. 1. 396 с.
- Определитель низших растений. Водоросли / Под общ. ред. *Л. И. Курсанова*. – М.: Советская наука, 1953. Т. 2. 312 с.
- Руководство по методам биологического анализа морской воды и донных отложений / Ред. *А. В. Цыбань*. – Л.: Гидрометеоздат, 1980. 191 с.
- Современные методы количественной оценки распределения морского планктона / Отв. ред. *М. Е. Виноградов*. – М.: Наука, 1983. 280 с.
- Федоров В. Д.* О методах изучения фитопланктона и его активности. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979, 168 с.
- Федоров В. Д., Кольцова Т. И., Смирнов Н. А., Сарухан-Бек К. К., Федоров В. В.* Экология планктона Белого моря. 1. Фитопланктон // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16, Биология. 1988. № 4. С. 25 – 30.
- Fritz L., Triemer R. E.* A rapid simple technique utilizing Calcofluor White M2R for the visualization of dinoflagellate thecal plates // Journal of Phycology. 1985. V. 21. P. 662 – 664.

Graham H. W. Studies in the morphology, taxonomy and ecology of the Peridiniales. *Scient // Results Cruise VII Carnegie 1928 – 1929*, Biol. 1942. V. 3. P. 1 – 129.

Graham L. E., Wilcox L. W. *Algae*. – N.Y.: Prentice-Hall, 2000. 700 p.

Hensen V. Über die Bestimmung des Planktons oder im Meere treibenden Materiales an Pflanzen und Tieren. – Fünfter Ber. Komm. Wiss. Untersuch. Dtsch. Meere Kiel 1882 – 1886, 1887, Bd XII – XVI, S. 1 – 108.

Hillebrand H., Dürselen C.-D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae // *J. Phycol.* 1999. V. 35. P. 403 – 424.

Holmes R. W. The dissolution of protoplasm in thecate dinoflagellates by ultraviolet induced oxidation // *Stain Technol.* 1967. V. 42, № 1. P. 34 – 5.

Hook R. An appendix to the directions for seamen, bound for far voyages // *Philos. Trans.* 1666. V. 1. № 9. P. 147 – 149, 1 pl.

Identifying of marine phytoplankton / Ed. *C. R. Thomas*. – SanDiego: Academic Press, 1997. 858 c.

Maranda L., Shimizu Y. *Amphidinium operculatum* var. nov. *gibbosum* (Dinophyceae), a free-swimming marine species producing cytotoxic metabolites // *Journal of phycology.* 1996. V. 32. P. 873 – 879.

Menden-Deuer S., Lessard E. J. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protest plankton // *Limnol. Oceanogr.* 2000. V. 45(3). P. 569–579.

Montagnes D. J. S., Berges J. A., Harrison P.J., Taylor F. J. R. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1994. V. 39. P. 1044 – 60.

Phytoplankton manual / Museum nat. d'histoire naturelle (Paris); Ed. by A. Sournia. Paris: UNESCO, 1978. 337 p.

Stosch H. A. von. Dinoflagellaten aus der Nordsee, I. Über *Cachonina* *niei* Loeblich (1968), *Gonyaulax grindleyi* Reinecke (1967) und eine Methode zur Darsteellung von Peridineen-pancern // *Helgol. wiss. Meeresunters.* 1969. V. 19, № 4. P. 558 – 68.

Stosch H. A. von. Pleurax, seine Synthese und seine Verwendung zur Einbettung und Darstellung der Zellwände von Diatomeen, peridineen und anderen Algen, sowie für eine neue Methode zur Elektivfärbung von Dinoflagellaten-Panzern // *Arch. Protistenk.* 1974. V. 116, № 1 – 2. P. 132 – 41.

Vetity P. G., Robertson C. Y., Tronzo C. R., Andrews M. G., Nelson J. R., Sieracki M. E. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 1992/ V. 37. P. 1434 – 46.

Оглавление

Предисловие	3
1. Терминология и основные характеристики морского фитопланктона	5
2. Обоснование задачи	6
3. Отбор проб фитопланктона	6
4. Концентрирование фитопланктона	8
5. Хранение и фиксация проб фитопланктона	11
6. Идентификация видов фитопланктона	13
7. Определение диатомовых водорослей	17
8. Экспресс-определитель родов диатомовых водорослей	20
9. Определение динофлагеллят	31
10. Экспресс-определитель родов динофлагеллят	35
11. Оценка численности и биомассы фитопланктона	40
12. Анализ полученных результатов	43
Приложение	45
Ссылки на источники изображений водорослей	57
Список литературы	58

Радченко Ирина Георгиевна

Капков Валентин Иванович

Федоров Вадим Дмитриевич

ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО СБОРУ И АНАЛИЗУ ПРОБ МОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА

Учебно-методическое пособие
для студентов биологических специальностей университетов

Подписано в печать 22.10.2010

Формат 84×108/16. Бумага офсетная

Печать офсетная. Усл. печ. л. 7,5

Издательство «Мордвинцев»

Москва, Ялтинская ул., 12, кв 147

Телефон: 8 903 019 13 35. E-mail: mail@pdfkniga.ru

Сайт: pdfkniga.ru

Отпечатано в типографии