

## МЕТОДИКИ ЗА ОБРАБОТКА И ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА ПРОБИ

### МЕТОДИКА ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРОФИЛИ НА ТЕМПЕРАТУРАТА И СОЛЕНОСТТА НА МОРСКАТА ВОДА ПО ДАННИ ОТ ИЗМЕРВАНЕ С ХИДРОФИЗИЧНА СОНДА SBE 911 PLUS

В България няма приет стандарт за обработка на данни от *in situ* измерване на вертикални профили на температурата  $T$  и солеността  $S$  на морската вода, получени от сондираща апаратура. Използваната в Института от океанология при БАН хидрофизичната сонда SBE 911 plus съдържа датчици за следните хидрофизични величини: налягане  $p$ , температура и електропроводимост  $C$ . От тях при потапянето на прибора от борда на научно-изследователския кораб във водата до достигане на избраната дълбочина за сондиране на водния стълб и обратно – към морската повърхност, за всеки измерван параметър постъпват данни с честота по няколко десетки херца. Солеността на морската вода се получава числено по общоприета формула като функция на температурата и електропроводимостта, дълбочината  $z$  (хоризонтът) на всяко измерване е проста зависимост от налягането, а от  $T$ ,  $S$  и  $p$  по утвърдена от Междуправителствената океанографска комисия към ЮНЕСКО зависимост се изчислява условната плътност на морската вода  $\sigma_t$ . Настоящата методика дефинира начина, по който от постъпилите в една хидрологична (океанографска) станция първични данни от измерванията с SBE 911 plus могат да бъдат реконструирани вертикалните, квазисинхронни по времето профили на  $T$  и  $S$ . Дискретността на тези профили (т.е. отстоянието по вертикала между определените при измерването отделни стойности) е 1 m, тя е съпоставима с линейните размери на прибора, препоръчана е от фирмата производител и е общоприет световен стандарт за този род прибори.

При описваната по-долу обработка се използва специализираният софтуер “Seasave V 7.21k” [<http://www.seabird.com/software/sbedataprocs-seasaverev.htm>] на фирмата-производител Sea-Bird Electronics inc., включващ широк набор от математически процедури за отстраняване от набора входяща информация на погрешни данни, филтриране на съдържащ се шум и последващо усредняване на измерените значения в рамките на приетата дискретност. Програмният продукт притежава подробно ръководство за ползвателя [1]. Фирмата оставя на клиента сам да избере кои от тях са най-подходящи за

конкретния басейн и за въведената организация на измервателния процес по време на експедиции. Отработената в секция „Физика на морето” към Института от океанология методика за обработката на входните данни за T и S, постъпили от прибора SBE 911 plus до получаване на техните вертикални разпределения (профили) включва следната последователност от основни стъпки:

1. преобразуване на данните от измерване в ASCII формат;
2. контрол за наличие на евентуални груби грешки при измерванията, породени от неправилна работа на прибора и тяхното отстраняване;
3. премахване на данните от повърхностния слой на морето, получени преди стабилизиране на посоката на придвижване на прибора по вертикала;
4. разделяне на данните, постъпили в режим на потапяне на прибора от тия в режим на издигане;
5. отстраняване на други локални неточности при измерването, породени от спецификата в работата на датчиците;
6. усредняване на данните по вертикала за всеки метър от интервала на измерване;
7. корекции на данните поради нарушаване на линейния ход на работата на датчиците при промяна в хидрологичната структура на водния стълб.

Предполага се, че по време на изпълнението на всяка една стъпка обработващият разполага със съответните графики на разпределението на по вертикала на данните за T и S и осъществява чрез тях визуален контрол. Важно изискване е операторът да е добре запознат със спецификата на измерваните хидрологични характеристики в изследваната акватория, за да реагира адекватно в случаите (особено в условията на т. 7), когато е необходимо вземане на експертно решение. Често определящ при вземане на подобно решение се оказва анализът на фоновата метеорологична обстановка не само по време на измерванията в океанографската станция, но и за периода на цялата експедиция. Затова препоръчително е по време на самите наблюдения да се осигури запис и на основните

метеорологични параметри на приводната атмосфера, които да бъдат на разположение на водещия обработката на данните.

По-долу ще бъдат разшифровани основните действия, които се извършват на всяка една стъпка.

**1. Преобразуване на данните измерване в ASCII формат.** С посочения по-горе програмен продукт се преобразуват постъпилите от датчиците първични двоични кодове в реални физични величини с отчитане на съответните поправъчни коефициенти, определени при калибровката на всеки един от датчиците. На тази стъпка измерените величини се преобразуват в специфичен фирмен *env*-формат от *ASCII* тип, което значително облекчава визуалния контрол и самата обработка при по-следващите стъпки. Резултатът от изпълнението на тази стъпка представлява редове от последователни стойности на  $p$ ,  $z$ ,  $T$ ,  $S$  и  $\sigma_t$ ;

**2. Контрол за наличие и отстраняване на евентуални груби грешки от измерванията, породени от неправилна работа на прибора.** При спомената по-горе висока честота на измерванията от няколко десетки херца са възможни отделни избивания на датчиците, водещи до груби грешки в измерванията. Налага се грешките от неправилната работа на прибора да бъдат установени и бракувани: такива са например появата на отрицателни стойности за електропроводимостта и налягането или на температури извън определени граници. Под „определени граници” се разбират онези стойности на измерваните физични величини, които не са физически обосновани и не могат да се наблюдават в съответния басейн: например температура на водата от  $50\text{ C}^\circ$  или  $-5\text{ C}^\circ$  или налягания на водния стълб, които съответстват на по-големи дълбочини от тази на точката на измерване или от последния хоризонт, до който е потопен приборът. Затова условно тази стъпка може да бъде наречена „*контрол по граничните стойности на измерванията*”, той се постига автоматично с използвания софтуер, както и ръчно от обработващия след визуален контрол на графиките на разпределението по вертикала на измерените величини;

**3. Премахване на данните от повърхностния слой на морето, получени преди стабилизиране на посоката на придвижване на прибора по вертикала.** При третата стъпка се премахват стойностите на измерваните величини, получени при потапянето на уреда във водата преди данните за налягането да се стабилизират. С това се отстраняват неточностите, породени от неустойчивото състояние в началния момент на потапянето на прибора в морето, когато последният изпитва паразитни колебания от трептенията на кабел-троса, на който е окачена сондата, от вълнението на морето и колебанията на изследователския кораб. Моментът на стабилизиране на данните се установява визуално от обработващия по измененията на регистрираните хоризонти, когато стойностите на същите започнат монотонно да нарастват, което е указание, че приборът потъва.

**4. Разделяне на данните, постъпили в режим на потапяне на прибора от тия в режим на издигане.** В общия случай данните, постъпващи в режим на потапяне на прибора се отличават от тия в режим на издигане (поради разлика в скоростта на потапяне и издигане на прибора, дрейфа на кораба по време на измерването и времевата изменчивост на измерваните параметри). Затова фирмата-производител препоръчва работа с първата група данни, а тези при изваждането на прибора към повърхността се използват в случай на необходимост от експертна оценка при т. 7;

**5. Отстраняване на други локални неточности при измерването, породени от спецификата в работата на датчиците.** Данните могат да съдържат и други локални неточности при измерването, породени от моментна неправилна работа на датчиците, които не са били уловени с извършените в т. 2 корекции или от различия в характеристиките на отделните датчици. Трябва да се има предвид, че неточности в измерванията на  $T$  водят до неточности и в данните за  $S$ , независимо че съответната електропроводимост е била установена без забележки по отношение на работата на самия датчик. За установяването и отстраняването от обработваните редове на подобен род грешки се извършва контрол на локалните статистически характеристики на данните като се използва възможността „Wild Edit” на специализирания софтуер *за отклонения от нормата*. Същността на проявление на подобни грешки се заключава в определяне на средната стойност и стандартното отклонение на данните по ансамбъл, т.е. за отделни

подинтервали като всеки подинтервал съответства примерно на воден стълб с височина около 1 m, а данните, за които разликата на стойността им със стандартното отклонение е по-голяма от предварително зададена стойност, се отхвърлят като негодни и не участват в по-нататъшната обработка. Тези проверки се правят поотделно за всяка една от наблюдаваните величини (налягане, температура и електропроводимост) с две итерации. Конкретните стойности на параметрите на програмата, използвани при обработката, са както следва: 1.5 за „Standard deviations for pass one”, 2 за „Standard deviations for pass two”, 30 за “Scans per block” и  $2 \cdot 10^{-3}$  за “Keep data within distance of the mean”.

**6. Усредняване на данните по вертикала за всеки метър от интервала на измерване.** На тази стъпка изчистените от изброените по-горе грешки данни за температурата и електропроводимостта се осредняват за всеки метър воден стълб – използва се приложението „Bin Average” на приложния софтуер. Определят се и съответстващите стойности на дълбочината, солеността и условната плътност на морската вода.

**7. Корекции на данните поради нарушаване на линейния ход на работата на датчиците при промяна в хидрологичната структура на водния стълб.** Въпреки проведените в предните точки усилия за отстраняване на грешките и неточностите при измерванията, след приключване на процедурите от т. 6 все още в профилите на T и S са възможни локални осцилации (шпайкове, spike), които нямат физически смисъл, а се дължат на различната инертност на датчиците. Те се установяват формално и с визуален контрол по графиките T и S като функция на дълбочината; появяват се като правило при прехода от един хидрологичен слой в друг, например от горния квазиеднороден слой в сезонния термоклин, при навлизане в халоклина или на долната граница на студения междинен слой. Тъй като S е функция на T и C, всяка неточност на температурата (например закъснение в отчета поради необходимост от време за темперирание на датчика) води до неточности и за S. Затова обработващият трябва да експертно да оцени според хидрологичните особености на слоя кой от датчиците е „закъснял” и да филтрира получените се в съответния профил зигзаци. Освен това се проверяват и всички аномалии (инверсии) в полетата на T и S – те могат да се запазят, ако е изпълнено условието за

устойчивост  $\frac{\partial \sigma_t}{\partial z} \geq 0$  или ако съществуват физически причини според метеорологичната информация (например зимна конвекция или студен междинен слой). За да се провери доколко описаните по-горе неточности действително съществуват се прави сравнителен анализ с данните от профила „нагоре”, както и с данните от съседните по пространството и времето станции от същата експедиция, (ако съществуват такива). Във всички останали случаи подобни аномалии трябва да се отстранят.

За преодоляване на описаните в настоящия пункт неточности при измерванията се използва филтър на пълзящо средно или високочестотен косинус-филтър, така-щото в общия случай за окончателните данни да е изпълнено условието за устойчивост. Окончателно се оформят таблици с данни за z, T и S.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

[<sup>1</sup>] SBE Data Processing\_5.25, User’s Manual, Bellevue, Washington, 2002.

# МЕТОДИКИ ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА ХИМИЧНИ ПРОБИ

## ***I. МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРНА ОБРАБОТКА НА ФИЗИКОХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ***

### **1. Азот амониев - БДС ISO 7150-1:2002**

Спектрометричен метод

Спектрометрично измерване на абсорбцията при 655nm на синьото съединение, получено при реакцията на амоняк със салицилатни и хипохлоритни йони в присъствието на натриев нитрозопентацианоферат (III) (натриев нитропрусид). Хипохлоритните йони се получават *in situ* чрез алкална хидролиза на натриева сол на N,N'-дихлор-1,3,5-триазин-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-трион, (натриев дихлоризоцианурат). Реакцията на хлорамин с натриев салицилат се извършва при рН 12,6 в присъствието на натриев нитропрусид. Граница на определяне: 0.008 mg/dm<sup>3</sup>.

### **2. Азот нитратен – ВЛМ №1/2006**

Спектрометричен метод със сулфосалицилова киселина

Методът се състои в спектрометрично измерване на светлинната абсорбция на образуваното жълтооцветено съединение от реакцията на нитратите със сулфосалицилова киселина (образувана чрез прибавяне към пробата на натриев салицилат и сярна киселина) след обработка с основа. Едновременно с основата се прибавя двунатриева сол на етилендиаминтетраоцетна киселина (Na<sub>2</sub>EDTA) за предотвратяване утаяването на калциеви и магнезиеви соли. Пречещото влияние на нитритите се отстранява чрез прибавяне на натриев азид. Граница на определяне: 0.013 mg/dm<sup>3</sup>.

### **3. Азот нитритен - БДС EN 26777:1997**

Молекулен абсорбционен спектрометричен метод

Методът се основава на реакцията на съдържащия се в пробата за анализ нитрит с 4-аминобензолсулфонамид при наличие на ортофосфорна киселина и стойност на рН 1,9.

Получава се diaзониева сол и чрез едновременно прибавяне на N-(1-нафтил)-1,2-диаминоетан-дихидрохлорид се образува розово оцветено съединение. Абсорбцията се измерва при 540nm. Граница на определяне: 0.002 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **4. Общ азот - БДС EN ISO 11905-1:2004**

Метод с използване на окислително разлагане с пероксидисулфат

Амонякът, нитритът и много органични азотсъдържащи съединения в пробата за изпитване се окисляват до нитрат при използване на пероксидисулфат в буферирана алкална система чрез кипене при повишено налягане в затворен съд.

След това се извършва редукция на нитрата до нитрит чрез преминаване на разтвора от разлагането през смесителна спирала, съдържаща помеднен кадмий. Полученият нитрит реагира с 4-аминобензол сулфонамид и N-(1-нафтил)-1,2-диаминоетан дихидрохлорид до получаване на розово оцветяване. Фотометрично измерване се провежда при 540nm. Граница на определяне: 0.500 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **5. Фосфор (общ) - БДС EN ISO 6878:2005; ВЛМ №17/2012**

Спектрометричен метод с амониев молибдат

С цел минерализация на органичните фосфорсъдържащи съединения се провежда предварително окисление със пероксидисулфат при загряване. В следствие се определя сумата от разтворените фосфати и получените след минерализацията.

Реакцията на ортофосфатни йони с кисел разтвор, който съдържа молибдатни и антимоиеви йони до образуване на антимонов фосформолибдатен комплекс. Редукция на комплекса с аскорбинова киселина до образуване на синьо оцветен молибдатен комплекс. Измерва се светлинната абсорбция (поглъщателната способност) на този комплекс при 885nm, за да се определи концентрацията на присъстващите фосфати. Граница на определяне: 0.005 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **6. Фосфати - БДС EN ISO 6878:2005**

Спектрометричен метод с амониев молибдат



Реакцията на ортофосфатни йони с кисел разтвор, който съдържа молибдатни и антимоНИЕВИ йони до образуване на антимонов фосформолибдатен комплекс. Редукция на комплекса с аскорбинова киселина до образуване на синьо оцветен молибдатен комплекс. Измерва се светлинната абсорбция (поглъщателната способност) на този комплекс, за да се определи концентрацията на присъстващите фосфати при дължина на вълната при 885nm. Граница на определяне: 0.005 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **7. Силиций – ВЛМ №17/2012**

Вътрешно лабораторен метод за определяне съдържанието на микроелементи в морски води чрез плазмена оптико-емисионна спектроскопия. Основата на метода е измерването на емисия светлина чрез оптична спектроскопия. Граница на определяне: 0.01 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **8. Желязо - ВЛМ №17/2012**

Вътрешно лабораторен метод за определяне съдържанието на микроелементи в морски води чрез плазмена оптико-емисионна спектроскопия. Основата на метода е измерването на емисия светлина чрез оптична спектроскопия. Граница на определяне: 0.001mg/dm<sup>3</sup>.

#### **9. Манган - ВЛМ №17/2012**

Вътрешно лабораторен метод за определяне съдържанието на микроелементи в морски води чрез плазмена оптико-емисионна спектроскопия. Основата на метода е измерването на емисия светлина чрез оптична спектроскопия. Граница на определяне: 0.0005 mg/dm<sup>3</sup>.

#### **10. рН - ISO 10523:2008 (E)**

Определяне с помощта на потенциометър и рН-електрод предварително калибриран с два буферни стандартни разтвора. Граница на определяне: 2.

#### **11. Разтворен кислород - ISO 5813:1983 (E)**

Принципът на метода (Винклер) се основава на реакцията на разтворения кислород с манганов (II) хидроксид (образуван чрез добавяне на натриева/калиева основа в присъствие на калиев йодид към манганов (II) сулфат/хлорид). Утайката се разтваря чрез подкиселяване. При това манганът преминава в по-висока валентност и окислява йодидния йон до еквивалентно количество йод. Определянето на освободения йод се извършва, чрез титруване с натриев тиосулфат и е еквивалентно на разтворения в пробата кислород. Граница на определяне: 0.2 mg/l.

### **12. Биохимична потребност от кислород (БПК5) - EN 1899-2:1998**

Определяне на съдържанието на разтворен кислород в предварително наситена с кислород проба и паралелно на заложената такава от същата вода за 5 денонощия при 20°C на тъмно. Граница на определяне: 0.2 mg/l.

### **13. Органичен въглерод в седименти**

Спектрофотометричен метод основан на измерване на абсорбцията на разтвор съдържащ бихроматен йон при дължина на вълната 590 nm след предварително окисление на седиментната проба с калиев бихромат в сяронокисела среда (Методы...,1980). Граница на определяне: 0.01%.

## **ЛИТЕРАТУРА**

Азот амониен - БДС ISO 7150-1:2002

Азот нитратен - ВЛМ №1/2006

Азот нитритен - БДС EN 26777:1997

Общ азот - БДС EN ISO 11905-1:2004

Фосфор (общ) - БДС EN ISO 6878:2005; ВЛМ №17/2012

Фосфати - БДС EN ISO 6878:2005

Силиций – ВЛМ №17/2012

Желязо - ВЛМ №17/2012

Манган - ВЛМ №17/2012

pH - ISO 10523:2008 (E)

Разтворен кислород - ISO 5813:1983 (E)

БПК5 - EN 1899-2:1998

Методы исследования органического вещества в океане. 1980. (Ред. Е. Романкевич),  
Наука, М., 343.

## ***II. МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРНА ОБРАБОТКА НА ХИМИЧНИ ПАРАМЕТРИ***

Antracene, PAHs, Fluoranthene, Naphtalene - MSZ 1484-6:2003

Atrazine – WBSE-47:2010 (1)

DEHP - EPA Method 8270D:2007(1)

Hexachlorobenzene, Pentachlorobenzene - MSZ 1484-8:2004(1)

Hexachlorobutadiene - MSZ 1484-5:1998 7.3.section (1)

Octylphenols MSZ EN ISO 18857-1:2007(1)

Tributyltin compounds - EN ISO 17353F13A

Pb, Hg, Ni, Cd, Zn, Cu, As, Al, Co - EPA Method 200.8:1999 (1); MSZ EN ISO  
17294-2:2005(2); MSZ 1484-3:2006; MSZ 1483:2007

Li – EPA Method 6010 C:2007(2); MSZ EN ISO 11885:2000(2)

Cr (VI) – MSZ 11083:2003 (1); MSZ EN ISO 18412:2007 (1);

Petroleum Hydrocarbons – MSZ 1484-4:1998; MSZE 1484-7:2005

PCBs – MSZ 1484-11:2003(1)

o,p-DDE, o,p-DDD, p,p-DDD, o,p-DDT - WBSE-47:2010 (1)

Terbutryn - WBSE-47:2010(1)

Ethilbenzen – MSZ 1484-4:1998

DEP, DBP - EPA Method 8270D:2007(1)

Bisphenol A – EPA Method 1694:2007(1)

Xylenes(p+m Xylene) - MSZ 1484-4:1998

TOC - MSZ 1484-4:1998(1)

## **МЕТОДИКИ ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА БИОЛОГИЧНИ ПРОБИ**

### **III. МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРНА ОБРАБОТКА НА ФИТОПЛАНКТОННИ ПРОБИ И ХЛОРОФИЛ „А”**

#### **I.1 МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРНА ОБРАБОТКА НА ФИТОПЛАНКТОННИ ПРОБИ**

##### **Оборудване**

- обрънат микроскоп Nikon Eclipse TE-2000-U, с вградена „video-interactive image analysis” система

##### **Анализ**

Фиксираните на борда на плавателния съд проби за анализ на фитопланктон, след съхранение на хладно и тъмно за не по-малко от 20 дни (Utermöhl, 1938) се отдекантират до обем 50 cm<sup>3</sup>. Таксономичното определяне (до вид) се извършва на обрънат микроскоп Nikon Eclipse TE-2000-U, с вградена „video-interactive image analysis” система. Количественият анализ на пробите и таксономична идентификация на видовете се извършва в броителни камери (Sedgwick-Rafter – 1 ml) по стандартна методика (Moncheva & Parr, 2005 - updated 2010). Във всяка проба се изброяват по 400 клетки, като редките видове се отчитат в цялата камера. Обемът на всеки вид ( $V, \mu m^3$ ) се изчислява по формула, съответстваща на най-близката до формата на вида геометрична фигура (Edler, 1979) и след това се преизчислява в тегло ( $W, ng$ ) с коефициента на Hutchinson (1967). Видовете са определени по Carmelo (1997) и Fukuyo (2000), валидирани таксономично с WoRMs web - класификационната система (World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org>).

Пробонабирането, лабораторният анализ и качественият контрол се извършва по унифицирани методики (Moncheva & Parr, 2005 - updated 2010; QC/QA guidelines-phytoplankton - Moncheva, 2010).

## **I.2 МЕТОДИКА ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА ХЛОРОФИЛ “А”**

### **Оборудване**

- спектрофотометър – NOVA 400, MERCK (СПЕКОЛ 11)
- кювети с оптична дължина между 1см и 5см
- центрофуга - ALC, mod. РК 130
- ацетон - 90%
- HCL киселина - 1n
- центрофужни епруветки - 50 мл

### **Анализ**

Филтрите се заливат с 10 мл студен 90% ацетон и се хомогенизират с дезинтегратор за 1 мин. Екстрахират се за 18-20 часа в хладилник при температура +8° C - + 10°C. След центрофугиране при 7000 g/min екстрактът се измерва спектрофотометрично при следните дължини на вълната: 750, 665, 663, 645, 630, 480 и 430 nm. След подкисляване с 1n HCL в рамките на 5 мин се мери екстинкцията при 750 и 665 nm. Резултатите се осредняват от три паралелни измервания. Мътността и разликата между кюветите не превишава 0.002 при 750 nm.

За изчисленията се използват уравненията на Jeffrey and Humphrey (1975) и специализирана компютърна програма.

Точността на метода е 0.1 [mg.m<sup>-3</sup>] и стандартната грешка не превишава 10% (Edler L. 1979).

### **Литература**

- Appeltans W., Bouchet P., Boxshall G.A., De Broyer C., de Voogd N.J., Gordon D.P., Hoeksema B.W., Horton T., Kennedy M., Mees J., Poore G.C.B., Read G., Stöhr S., Walter T.C., Costello M.J. (eds) 2012. World Register of Marine Species. <http://www.marinespecies.org>
- Carmelo, T.R. [ed] 1997. Identifying Marine Phytoplankton, Academic Press USA. 858 pp.

- Edler, L. [ed] 1979. Recommendations on methods for Marine Biological Studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. Baltic Marine Biologists Publication, 5: 38 pp.
- Fukuyo Y. 2000. Atlas of Dinoflagellates prepared for Harmful Algal Bloom Program of IOC and HAB project of WESTPAC/IOC, distributed by the Grant-in-Aid for Scientific Research (B) No.09556043 from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan. (CD-ROM ver. 1.5/Nov. 1, 2000).
- Hutchinson G.E. 1967. A treatise on Limnology. II. Introduction to lake biology and limnoplankton. John Wiley and Sons, New York, 1115 pp.
- Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP). 167.
- Moncheva S. 2010. QA/QC Guidelines for biological data – phytoplankton. Black Sea Commission (Deliverable Project UP-GRADE Black Sea SCENE)
- Moncheva S., Parr B. 2005. (updated 2010). Manual for Phytoplankton Sampling and Analysis in the Black Sea. Black Sea Commission (Deliverable Project UP-GRADE Black Sea SCENE)
- Utermöhl H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. Mitt. Int.Verein. Theor. Angew. Limnol., 9: 1-38.

## **II МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА ЗООПЛАНКТОННИ ПРОБИ**

Отбраните проби на борда на кораба, след фиксирането им с 4% буфериран разтвор на формалдехид и най-малко 20 дни престояване за добра фиксация и утаяване се концентрират до 200-150 мл в лабораторни условия. Всяка проба се етикетира с информация за дата, час, номер на станцията, дълбочина на станцията, дълбочинен хоризонт и лабораторен номер на пробата. С калибрирана щемпел пипета се отбира под-проба (1 мл) от вече концентрираната и добре разбъркана проба. Под-пробата се разлива в камера на Богоров за последвала идентификация на видовете и количественото им определяне. След преброяването на първата под-проба се поставя втора под-проба. С цел постигане на максимално точни резултати в количествената оценка на зоопланктона от 5 до 10 под-проби трябва да бъдат преброени. Доминиращите три вида се броят в под-пробите, докато всеки един от тях достигне 100 бр., след което се прекратява тяхното

отчитане. По отношение на големите видове като *Calanus euxinus*, ларвите на Decapoda, яйцата и ларвите на рибите се броят в цялата проба, а ако са многобройни се разделят на под-проби с Фолсом или Мотода сплитер (разделящ пробите на равни части). Накрая цялата проба се преглежда за отчитане на редки видове. Числеността се представя в екз.м<sup>3</sup>. Биомасата на зоопланктона (мг.м<sup>-3</sup>) се определя по Петипа (1957) с използването на стандартни индивидуалните тегла на съответните видове. Числеността на съответния вид по индивидуалното му тегло води до установяването на биомасата на вида.

Различна микроскопска техника се използва за определяне на зоопланктона, но предимно стерео-микроскоп с увеличение 2x8 или 4x6. За таксономичното определяне на видовете се използват следните определители: Mordukhay-Boltovskoy, 1968a, 1968b, 1969, 1972, 1987; Murina, 2005, валидирани таксономично с WoRMs web -класификационната система (World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org>;

## Литература

- Korshenko A. & Aleksandrov B. 2014. Zooplankton Manual of Biological methodology in the Black Sea area. Black Sea Commission. (draft version)
- Mordukhay-Boltovskoy, F.D. (1968a): Order Copepoda / In.: Atlas of Invertebrate Animals of the Caspian Sea. Moscow: Pischevaya promyshlennost Publ., P.160-182 (in Russian).
- Mordukhay-Boltovskoy, F.D. (Ed.). (1968b): The identification book of the Black Sea and the Sea of Azov Fauna.- Kiev: Naukova Dumka Publ., T. 1 (Protozoa, Porifera, Coelenterata, Ctenophora, Nemertini, Nematelminthes, Annelida, Tentaculata), 423 pp. (in Russian).
- Mordukhay-Boltovskoy, F.D. (Ed.). (1969): The identification book of the Black Sea and the Sea of Azov Fauna – Kiev. Naukova Dumka Publ., T. 2 (Arthropoda: Cladocera, Calanoida, Cyclopoida, Monstrilloida, Harpacticoida, Ostracoda, Cirripedia, Malacostraca, Decapoda), 536 pp. (in Russian).
- Mordukhay-Boltovskoy, F.D. (Ed.). (1972): The identification book of the Black Sea and the Sea of Azov Fauna.- Kiev: Naukova Dumka Publ., T. 3 (Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Chaetognatha, Chordata: Tunicata, Ascidiacea, Appendicularia), 340 pp. (in Russian).
- Mordukhay-Boltovskoy, F.D., Rivjer, I.K., (1987): Predatory Cladocera Podonidae, Polyphemidae, Cercopagidae and Leptodoridae of the World fauna, Leningrad: Nauka Publ., 182 pp. (in Russian).

Murina, V.V. (2005): A Manual for identification of pelagic polychaeta larvae from the Black Sea.- Sevastopol: EKOSI-Gydrofizika, 67 pp. (in Russian).

Petipa, T.S., 1959. On average weight of main forms of zooplankton. The studies of Sevastopol Biological Station, No 5, pp. 13

World Register of Marine Species - <http://www.marinespecies.org>

### **III. МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА МАКРОФИТОБЕНТОС И МОРСКИ ТРЕВИ**

В лабораторията пробите, които са били фиксирани във формалин, се изваждат от съдовете и се промиват неколkokратно с чешмяна вода, за да се отстрани доколкото е възможно формалинът. Замразените проби се размразяват на стайна температура.

След това внимателно, с помощта на пинсети, се отделят отделните видове/родове водорасли, представени в пробата. Всяка така отделена група водорасли се промива с чешмяна вода през сито, за да се отстранят твърдите частички /песъчинки, черупки и пр./

След това се сортират в петриеви панички и идентифицират до най-ниското възможно таксономично ниво, с помощта на стереомикроскоп Олимпус, включително най-малките видове (инкрустиращи водорасли) (Minicheva, 2003, Orfanidis 2012).

Видовата идентификация се осъществява с определители на Зинова, 1967, Димитрова-Конаклиева, 2000, Темнискова и др., 1999, Short F.T., R. G. Coles eds, 2001.

След това всеки вид се подсушава върху филтърна хартия, за да се отстрани излишната влага, до момента, в който поставена и притисната върху водораслите хартия, не се намокря.

Пробата се изтегля на аналитична везна, с прецизност до втория знак, за определяне на мокро тегло, което е изходна данна за изчисляване на екологичния индекс EI (Dencheva, Doncheva, 2014).

Таксономията е стандартизирана, като се използва интернет – база данни Algae base: <http://www.algaebase.org>.



## Литература

Темнискова Д., Воденичаров Д., Киряков И., Стойнева М., Младенов Р., 1999. Ръководство за упражнения по систематика на водорасли и гъби. PENSOFT, София-Москва.

Algae base: <http://www.algaebase.org>

Dimitrova-Konaklieva, S. 2000. Marine Algae of Bulgaria (Rhodophyta, Phaeophyta, Chlorophyta). Pensoft, Sofia (in Bulgarian).

Minicheva G. G., A. B. Zotov, M. N. Kosenko. 2003. Methodical recommendations for determining the complex of morpho-functional parameters of unicellular and multicellular forms of aquatic vegetation// GEF Project for renewal of the Black Sea ecosystem., INBUM, Odessa, 32 p.

Orfanidis S., Dencheva K., Nakou K., Basset 2012. A. Benthic macrophyte changes across an anthropogenic pressures gradient in Mediterranean and Black Sea water systems: structural vs. functional approaches. Current questions in water management (Eds. A Schmidt-Kloiber, A. Hartmann, J. Strackbein, Ch. K. Feld & D. Hering WISER final conference Tallinn, Estonia, 25-26 January 2012, 147-149 p., ISBN 978-9949-484-19-5.

Short F.T., R. G. Coles eds, 2001. Seagrass research methods. *Ed. Frederick T. Short, Catherine A. Short and Robert G. Coles.* Elsevier, pp. 482. ISBN: 978-0-444-50891-1

Zinova, A. 1967. Guidebook of the Green, Brown and Red Algae of the Southern Seas of USSR. Nauka, Moskva (in Russian). pp. 396

## IV. МЕТОДИКА ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ НА МАКРОЗООБЕНТОС

Лабораторната обработка включва сортиране, определяне на таксономичния състав до видово или възможно най-ниско надвидово ниво и определяне на числеността и биомасата (влажно тегло) на организмите в пробата.

**Сортиране и определяне.** Порции от несортираната проба се промиват с течаща чешмяна вода под аспиратор през сита с размер на окоето 1.0 x 1.0 mm и 0.5 x 0.5 mm. При наличие на мегафауна се използва сито с размер на окоето 5 mm. Фракциите се сортират отделно под бинокуляр или лупа. Първичното сортиране се извършва до четирите основни таксономични групи – червеи (Annelida), мекотели (Mollusca), членестоноги (Arthropoda) и други (Miscellanea). На следващия етап екземплярите се определят до вид или на

възможно най-ниското надвидово таксономично ниво – род, семейство, разред и т.н. Трите основни групи за Черно море - Polychaeta, Mollusca и Crustacea се определят на видово равнище. Таксономичните определители и ключове, използвани при определянето са изброени в списъка на таксономичната литература по-долу.

**Численост.** Числеността на макрозообентоса се определя чрез преброяване на екземплярите под бинокулар с подходящо увеличение. При индивидите, които не са цели, се броят само главовите части (за полихетите и ракообразните) или зоната на свързване (лигамент) на мидите.

**Биомаса.** Биомасата се определя като влажно тегло. Фиксираните организми се подсушават върху филтърна хартия за отнемане на външната течност. Черупчестите организми се теглят с черупките. Тръбестите организми се теглят след отстраняване на черупките. Подсушените организми се прехвърлят върху предварително тариран съд и претеглят на технически везни с точност 0.0001 g.

#### **Таксономична литература**

- Киселева М.И., 2004. Многощетинковые черви (Polychaeta) Черного и Азовского морей. Изд-во Кольского научного центра РАН, 409 с.
- Маринов Т., 1977. Фауна на България т. 6, Многочетинести червеи (Polychaeta), Издателство на БАН, София, 258 стр.
- Мордухай-Болтовской Ф. Д., 1968. Определитель фауны Черного и Азовского морей, Том первый, Наукова думка, Киев, 437 с.
- Мордухай-Болтовской Ф. Д., 1969. Определитель фауны Черного и Азовского морей, Том второй, Наукова думка, Киев, 536 с.
- Мордухай-Болтовской, Ф. Д., 1972. Определитель фауны Черного и Азовского морей, Том третий, Наукова думка, Киев, 340 с.
- Fauvel, P., 1923. Polychètes errantes. Faune de France, Vol. 5, Paris.
- Fauvel, P., 1927. Polychètes sédentaires. Faune de France, Vol. 16, Paris.
- Muller G.I. (Ed.), 1995. Determinatorul Ilustrat al florei si faunei Romaniei. Vol. I – Meduile Marine, Bucuresti.
- Marine Species Identification Portal. <http://species-identification.org/index.php>