

INSPEKCJA OCHRONY ŚRODOWISKA

PRZEWODNIKI METODYCZNE

DO BADAŃ TERENOWYCH I ANALIZ LABORATORYJNYCH ELEMENTÓW BIOLOGICZNYCH WÓD PRZEJŚCIOWYCH I PRZYBRZEŻNYCH



FITOPLANKTON



MAKROBEZKRĘGOWCE BENTOSOWE



MAKROGLONY I OKRYTOZALĄŻKOWE

ISBN 978-83-61227-36-6

Biblioteka Monitoringu Środowiska

Warszawa 2010

INSPEKCJA OCHRONY ŚRODOWISKA

PRZEWODNIKI METODYCZNE DO BADAŃ TERENOWYCH I ANALIZ LABORATORYJNYCH ELEMENTÓW BIOLOGICZNYCH WÓD PRZEJŚCIOWYCH I PRZYBRZEŻNYCH



Sfinansowano ze środków
Narodowego Funduszu Ochrony
Środowiska i Gospodarki Wodnej

Biblioteka Monitoringu Środowiska

Warszawa 2010

Opracowano w Samodzielnej Pracowni Ekologii Instytutu Morskiego w Gdańsku w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska na zamówienie Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska i sfinansowano ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej.

Druk sfinansowano ze Środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej na zamówienie Ministra Środowiska.



Sfinansowano ze środków
Narodowego Funduszu Ochrony
Środowiska i Gospodarki Wodnej

Zespół autorski:

Lidia Kruk-Dowgiałło, Monika Michałek-Pogorzelska, Maciej Dubiński, Paulina Brzeska, Radosław Opióła, Marek Kuliński, Andrzej Osowiecki, Magdalena Błęńska

© Copyright by Inspekcja Ochrony Środowiska, Warszawa 2010

ISBN 978-83-61227-36-6

Wydanie I.

Nakład 500 egzemplarzy

Opracowanie wydawnicze: Marta Pobereszko, Joanna Fundowicz

Druk i oprawa:



Wydawnictwo Naukowe Instytutu Technologii Eksploatacji – PIB
26-600 Radom, ul. K. Pułaskiego 6/10, tel. centr. (048) 364-42-41, fax (048) 364-47-65
e-mail: instytut@itee.radom.pl, <http://www.itee.radom.pl>

Spis treści

FITOPLANKTON	5
---------------------------	----------

Lidia Kruk-Dowgiałło, Monika Michalek-Pogorzelska, Maciej Dubiński

MAKROGLONY I OKRYTOZALĄŻKOWE	33
---	-----------

Lidia Kruk-Dowgiałło, Paulina Brzeska, Radosław Opiola, Marek Kuliński

MAKROBEZKRĘGOWCE BENTOSOWE	65
---	-----------

Andrzej Osowiecki, Magdalena Błęska

PRZEWODNIK METODYCZNY DO BADAŃ TERENOWYCH
I ANALIZ LABORATORYJNYCH FITOPLANKTONU,
INNEJ FLORY WODNEJ I MAKROBEZKRĘGOWCÓW
BENTOSOWYCH W WODACH PRZEJŚCIOWYCH
I PRZYBRZEŻNYCH

FITOPLANKTON



**Lidia Kruk-Dowgiałło,
Monika Michałek-Pogorzelska, Maciej Dubiński**

Spis treści

1. Wprowadzenie	7
2. Słowniczek pojęć	7
3. Pobór prób	8
3.1. Strategia poboru prób	8
3.2. Próby ilościowe	9
3.3. Próby jakościowe	9
4. Konserwacja	11
5. Procedury analityczne	12
5.1. Sprzęt	12
5.2. Analiza jakościowa	12
5.3. Analiza ilościowa	13
5.3.1. Sedymentacja	13
5.3.2. Zliczanie i pomiar organizmów przy użyciu mikroskopu odwróconego	16
6. Obliczenia i wyniki	19
6.1. Liczebność	19
6.2. Biomasa	20
6.2.1. Objętość komórkowa	20
6.2.2. Obliczenia objętości plazmy	26
6.2.3. Obliczanie zawartości węgla	27
6.4. Wyniki	27
7. Analiza półilościowa	28
8. Literatura	28

1. Wprowadzenie

Fitoplankton jako pierwsze ogniwo łańcuchów troficznych w biocenozach wodnych jest ściśle powiązany z parametrami abiotycznymi, a w szczególności z zawartością soli biogennych, temperaturą i zasoleniem wody. Jest to formacja ekologiczna szybko reagująca na wszelkie zmiany środowiskowe zachodzące pod wpływem czynników fizykochemicznych i dzięki temu może być traktowana jako wskaźnik stanu ekologicznego danego akwenu. Główne zalety tego rodzaju analiz to:

- dobry wskaźnik zmian stanu troficznego,
- łatwość pobierania próbek,
- mało skomplikowane procedury analityczne.

Celem przewodnika jest określenie procedur postępowania przy poborze prób fitoplanktonu oraz ich analizie laboratoryjnej zgodnie z wytycznymi Ramowej Dyrektywy Wodnej UE (RDW), w oparciu o procedury monitoringu fitoplanktonu HELCOM COMBINE (http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/AnnexesC/en_GB/annex6).

Analiza składu gatunkowego, liczebności i biomasy fitoplanktonu umożliwia:

- określenie wieloletnich zmian składu gatunkowego, liczebności, biomasy i występowania zakwitów fitoplanktonu,
- określenie zasięgu przestrzennego zakwitów fitoplanktonu,
- zidentyfikowanie gatunków toksycznych i wskaźnikowych.

2. Słowniczek pojęć

- **Fitoplankton** – zbiorowisko organizmów roślinnych zaadaptowanych do utrzymywania się w toni wodnej, biernie podległe ruchom wody wywołanym wiatrem, prądami wody (Reynolds 1984).
- **Zakwity** – masowy rozwój glonów w wodzie (całkowita biomasa fitoplanktonu $\geq 3 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$, stężenie chlorofilu $a \geq 20 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) (Nebaeus 1984).
- **Gatunki toksyczne** – gatunki (z grupy sinic, bruzdnic, haptofitów, rafidofitów i okrzemek) mające zdolność wytwarzania substancji toksycznych, wydzielanych do wody przyżyciowo lub po obumarciu komórek (Gentile 1971).
- **Gatunki wskaźnikowe** – gatunki o wąskim zakresie tolerancji względem niewielkiej liczby czynników ograniczających.
- **Punkt pomiarowo-kontrolny (ppk)** – miejsce poboru prób i wykonania pomiarów, monitorowane w celu uzyskania informacji niezbędnych do określenia stanu jakości ekologicznej danej części wód. Punkt pomiarowo-kontrolny opisany jest symbolem oraz współrzędnymi geograficznymi.
- **Takson** – jednostka systematyczna, odrębna pod względem biologicznym, morfologicznym i genetycznym, zaliczana do określonej kategorii systematycznej np. typ, rodzina, rodzaj, gatunek.

3. Pobór prób

3.1. Strategia poboru prób

Dla scharakteryzowania elementu biologicznego jakim jest fitoplankton, pobiera się trzy rodzaje prób: próby do analizy stężenia chlorofilu-a, próby ilościowe do określenia liczebności i biomasy oraz próby jakościowe do oznaczenia struktury gatunkowej.

Skład gatunkowy, liczebność i biomasa fitoplanktonu stanowią podstawę do określenia jego zmian w czasie. Taki stan wiedzy można osiągnąć przez częsty pobór prób z kilku ppk, reprezentujących wszystkie typy wód. Fitoplankton charakteryzuje się dużą zmiennością sezonową. W celu jej uchwycenia należy pobierać próby z dużą częstotliwością w ciągu całego roku.

Przed rozpoczęciem poboru prób, należy opisać pojemniki 250 cm³, w których będą one przechowywane. W opisie powinny znajdować się następujące dane: symbol próbki (fitopl.), nazwa ppk, warstwa (głębokość), rodzaj próbki (ilość/jakość) i data.

Przed rejssem należy sprawdzić i zapakować sprzęt, przyrządy i odczynnik (tab. 1). Karta poboru prób fitoplanktonu podczas badań terenowych znajduje się w załączniku nr 1 na końcu przewodnika.

Tabela 1. Wykaz przyrządu, sprzętu i odczynników niezbędnych podczas badań środowiskowych

Czynność	Przyrządy, sprzęt i odczynnik
pobór prób	sieć planktonowa (fot. 1) batometr (fot. 2) pojemnik plastikowy do integracji prób (duże wiadro) tryskawka lub butelka z otworem do płukania sieci wyciągarka z licznikiem (próby z rejsów na głębokich stacjach) termometr + salinometr (sonda CTD/CSTD)
konserwacja	plyn Lugola pipeta/dozownik
przewożenie, przechowywanie prób	oznakowane pojemniki (butelki) plastikowe o pojemności 250 cm ³ przenośna lodówka



Fot. 1. Sieć planktonowa (fot. M. Kuliński)



Fot. 2. Przykładowy rodzaj Batometru (fot. M. Kuliński)

W przypadku kiedy nie dysponujemy wyżej wymienionym sprzętem, pobieramy tylko podpowierzchniową (0,5–1 m) próbę ilościową.

3.2. Próby ilościowe

Procedury poboru podczas rejsów:

- W płytkich wodach przejściowych i przybrzeżnych (do 10 m), próby pobiera się za pomocą batometru (fot. 2) z poziomów pomiarowych 0,5–1 m, 2,5 m, 5 m i 7,5 m i 10 m lub 1 m nad dnem, jeśli głębokość nie przekracza 10 m. Przy głębszych stacjach pobieramy dodatkowo próby zintegrowane z poziomów 0–10 m i 10–20 m.
- Próbkę zintegrowaną otrzymuje się przez wlanie równych objętości wody z poziomów pomiarowych do dużego pojemnika. Ze zintegrowanej próbki wody należy odlać 250 cm³ do oznakowanego pojemnika, w którym znajduje się już 1 cm³ płynu Lugola.

3.3. Próby jakościowe

Próby tego typu służą do oznaczania składu gatunkowego fitoplanktonu.

Zalecany jest pobór prób siatką planktonową (fot. 1) o rozmiarze oczka 10 µm. W przypadku większej koncentracji fitoplanktonu zalecane jest używanie siatki o rozmiarze oczka 25 µm.

Próbkę jakościową pobiera się podczas zaciągu od dna (1 m nad dnem) do powierzchni. Jeśli pobierana jest próba pod powierzchniową, wówczas przeciągamy siatkę w poziomie na głębokości 0,5–1 m.

Procedury poboru podczas rejsów:

- przygotować stanowisko do płukania siatki: napełnić tryskawkę,
- przygotować opisane wcześniej szczelne pojemniki (250 cm³) na próby i wlać do nich za pomocą pipety 1,0 cm³ płynu Lugola,
- umocować siatkę do linki (fot. 3),
- opuścić siatkę na zadaną głębokość i powoli (ok. 0,1 m · s⁻¹) wyciągnąć siatkę na pokład statku (fot. 4),
- dokładnie spłukać siatkę wolnym strumieniem wody polewając zewnętrzną jej stronę, zwracając uwagę, aby spłukać materiał, który pozostał na wewnętrznych ściankach (fot. 5),
- przelać zawartość kolektora siatki do odpowiednio przygotowanego pojemnika (fot. 6),
- jeśli po przelaniu stwierdzimy, że zebranego materiału jest zbyt mało to należy powtórzyć procedurę,
- zebrany w ten sposób materiał jest gotowy do analizy mikroskopowej, podczas której określa się skład gatunkowy organizmów fitoplanktonowych w próbce,
- po zakończeniu poboru, siatkę należy dokładnie wypłukać i przygotować do poboru w następnym punkcie badań,



Fot. 3. Umocować siatkę do linki (fot. M. Kuliński)



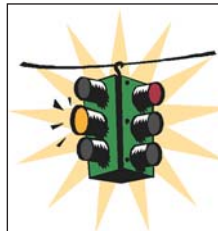
Fot. 4. Opuścić siatkę na zadaną głębokość (fot. M. Kuliński)



Fot. 5. Dokładnie spłukać siatkę wolnym strumieniem wody (fot. M. Kuliński)



Fot. 6. Przebrać zawartość kolektora siatki do przygotowanego pojemnika (fot. M. Kuliński)



Próby należy pobierać za dnia, najlepiej w godzinach południowych do godziny 15.

Po powrocie do laboratorium, siatkę należy dokładnie wypłukać w ciepłej słodkiej wodzie z dodatkiem niewielkiej ilości detergentu, rozwiesić i pozostawić do wyschnięcia w suchym przewiewnym miejscu.

W czasie transportu próby nie mogą być wystawione na bezpośrednie działanie promieni słonecznych i narażone na silne wstrząsy.

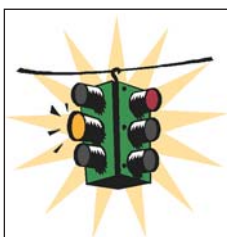
4. Konserwacja

Próby przeznaczone do analiz ilościowych jak i jakościowych są konserwowane przy użyciu kwaśnego płynu Lugola ($1,0 \text{ cm}^3/250 \text{ cm}^3$ pobranej wody).

Zalecane jest, aby płyn był wlewany jako pierwszy do pojemnika, w którym będzie przechowywana próba, tj. przed waniem do niego wody.

Zakonserwowane próby powinny być przechowywane w ciemności, w temperaturze $<10^\circ\text{C}$, jednak nie dłużej niż rok. Próby przechowywane dłużej są bezużyteczne.

Przechowywane dłużej próby należy co pewien czas (raz w miesiącu) przeglądać, jeśli ulegną odbarwieniu, ponownie dodać płynu Lugola, aż do uzyskania barwy ciemnożółtej (koniakowej).



Do prób konserwowanych płynem Lugola należy używać przezroczystych, bezbarwnych, odpornych na jodynę pojemników o pojemności 250 cm^3 , ze szczelnymi nakrętkami. Takie pojemniki pozwalają na obserwację ich zawartości i dodanie płynu konserwującego, gdy stężenie jodyny zmniejszy się.

Skład płynu Lugola, oraz sposób jego przygotowania:

Kwaśny płyn Lugola (Willen 1962)

100 cm^3	wody destylowanej lub dejonizowanej
10 g	jodku potasu (KI)
5 g	jodu (I_2)
10 cm^3	kwasu octowego (stęż. CH_3COOH)

- W kolbie miarowej rozpuścić krystaliczny jod i jodek w wodzie destylowanej dodać kwas octowy i dopełnić do objętości 100 cm^3 .
- Upewnij się, że dany składnik rozpuścił się całkowicie przed dodaniem następnego.
- Roztwór należy przechowywać w szczelnie zamkniętej szklanej ciemnej butelce w temp. $<10^\circ\text{C}$.
- Dodawać w objętości $0,5\text{--}1,0 \text{ cm}^3$ na 200 cm^3 próby.

5. Procedury analityczne

5.1. Sprzęt

Wyposażenie niezbędne do określania składu ilościowego i jakościowego fitoplanktonu obejmuje:

- mikroskop optyczny z obiektywem immersyjnym 100x – do analizy jakościowej
- mikroskop odwrócony – do analizy jakościowej (fot. 7),
- mikrometr okularowy liniowy z działką elementarną 0,1mm, okular mikrometryczny (siatka mikrometryczna okularowa, podzielona na 200 kwadratów),
- podstawowe obiektywy o parametrach 4x, 10x, 40x i 60x. Nie zaleca się stosowania obiektywów immersyjnych przy komorach Utermöhl'a ze względu na konieczność stosowania olejku,
- komory sedymentacyjne Utermöhl'a z odpowiednio dopasowanymi szkiełkami (grubości 0,16 mm – 0,20 mm) stanowiącymi dno komory (fot. 8),
- szkiełka nakrywkowe (42 mm x 42 mm, o grubości 1,2 mm) do zamknięcia komór po sedymentacji,
- podstawowe cylindry sedymentacyjne o pojemności 10, 25, 50 i 100 cm³ z dopasowaną przykrywką (fot. 8).



Fot. 7. Mikroskop odwrócony (fot. M. Dubiński)



Fot. 8. Zestawy sedymentacyjne (komora + cylindry) (fot. M. Dubiński)

5.2. Analiza jakościowa

Analizę jakościową przeprowadza się jedynie w celu określenia składu gatunkowego organizmów fitoplanktonowych występujących w danym ppk.

Próby jakościowe są również przydatne kiedy w próbie występuje takson w małej ilości i podczas analizy ilościowej nie jesteśmy w stanie określić jego przynależności taksonomicznej ze względu np. na jego zniekształcenie, zniszczenie lub ułożenie.

5.3. Analiza ilościowa

Poniższe zalecenie opiera się na technice liczenia przy użyciu mikroskopu odwróconego, według opisu Utermöhl'a (1958).

Ze statystycznego punktu widzenia sedymentacja i liczenie próby są dwoma dodatkowymi etapami wydzielania podpróby (chyba, że zakonserwowana podpróba jest liczona w całości, co nie jest realne), w wyniku których zmniejsza się precyzja szacowanych parametrów populacji (HELCOM za Venrick 1972 i Venrick 1978a).

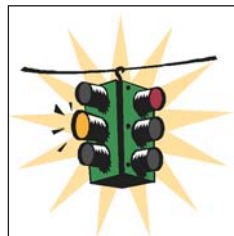
Analizę prób fitoplanktonu można podzielić na następujące etapy:

Etap I – Sedymentacja

Etap II – Zliczanie i pomiar organizmów przy użyciu mikroskopu odwróconego

5.3.1. Sedymentacja

- Przed przystąpieniem do sedymentacji próba powinna być przechowywana w temperaturze pokojowej tj. takiej, w której odbywać się będzie sedymentacja i analiza mikroskopowa, przynajmniej przez około 24 godziny, aby uniknąć tworzenia się bąbelków gazu w komorach sedymentacyjnych. Bąble gazu negatywnie wpłyną na sedymentację, rozkład komórek na dnie komory i obserwacje mikroskopowe.
- Przed przelaniem próby do kolumny sedymentacyjnej należy delikatnie, ale w sposób zdecydowany, stosując nieregularne potrząśnięcia, wymieszać zawartość butelek w celu homogenizacji próby. Zbyt gwałtowne wytrząsanie spowoduje powstanie dużej ilości małych bąbli, których trudno będzie się pozbyć, oraz może spowodować zniszczenie kolonii. Jeśli próba musi być energicznie wymieszana, aby rozbić skumulowane agregaty komórek, to należy tego dokonać nie później niż 1 godzinę przed rozpoczęciem sedymentacji.
- Ilość organizmów fitoplanktonowych w zebranej próbie zmienia się wyraźnie w zależności od terminu poboru i typu wody. W związku z tym należy dobrać odpowiedniej wielkości cylinder sedymentacyjny i czas sedymentacji. Typowe cylindry mają objętość 10, 25, 50 i 100 cm³. Małe stosujemy do analizy prób pochodzących z wód eutroficznych, oraz podczas sezonu wegetacyjnego (lato) – gdy zagęszczenie komórek jest duże, a większe – z wód oligotroficznych i/lub prób zebranych poza sezonem wegetacyjnym (zima), gdy zagęszczenie komórek jest małe. Odnosi się to zarówno do wód przybrzeżnych, przejściowych, jak i do wód otwartych.



Jeśli zagęszczenie komórek po zastosowaniu najmniejszego cylindra jest wciąż duże, należy zrezygnować z niego i próbę wody wlać bezpośrednio do komory sedymentacyjnej, a w niektórych przypadkach nawet próbę rozcieńczyć. W tym celu należy za pomocą pipety wlać do komory 1 cm³ wody destylowanej następnie 1 cm³ próbki i uzupełnić komorę wodą destylowaną w takiej ilości, aby pod szkiełkiem nakrywkowym nie znajdowało się powietrze.

- Zestawy sedymentacyjne (komory i cylindry) należy umieścić na poziomej powierzchni i nie wolno wystawiać ich na zmiany temperatury oraz bezpośrednie światło słoneczne. Nakrycie zestawów odwróconym do góry dnem plastikowym pudełkiem zapewni w miarę bezpieczne i niezakłócone warunki sedymentacji. Problem parowania zostanie znacznie zmniejszony, jeżeli pod pudełkiem zostanie umieszczona bibuła nasączona wodą. Podstawowym wymogiem jest, aby powierzchnia, na której stoi zestaw, nie wibrowała, gdyż wibracje spowodują układanie się komórek w skupiska w postaci podłużnych grzbietów i dolin.
- Czas sedymentacji zależy od wysokości zestawu komory i kolumny oraz środka konserwującego (HELCOM za Hasle 1978 i Rott 1981). Podane poniżej czasy minimalne (tab. 2) są zalecane przy stosowaniu płynu Lugola. Jeżeli występuje problem wibracji, np. spowodowanej ruchem drogowym, to nie należy w znaczny sposób przekraczać czasu minimalnego. W innych przypadkach zakończenie procesu sedymentacji powinno nastąpić nie później niż w ciągu 4 dni.

Tabela 2. Zalecany minimalny czas sedymentacji

Objętość komory/cylindrów (cm ³)	Wysokość komory/cylindrów (cm)	Czas sedymentacji (godz.)
3 (komora)	0,5	3
10	2	8
50	10	24
100	20	48

- Próby niepolicone w ciągu tygodnia od zakończenia sedymentacji należy powtórzyć. Dolne komory zestawu sedymentacyjnego, które nie są natychmiast analizowane, należy przechowywać w atmosferze o 100% wilgotności.
- Komory o pojemności 100 cm³ powinny być stosowane z ostrożnością, gdyż prądy konwekcyjne w komorach o wysokości przekraczającej 5-krotną średnicę podstawy zakłócają sedymentację fitoplanktonu (HELCOM za Nauwerck 1963 i Hasle 1978). Komory te można stosować tylko wtedy, gdy liczebność fitoplanktonu jest bardzo niska, np. późną jesienią i zimą. W przypadku takich prób zalecane jest obejrzenie całego dna komory.

- Jeżeli komórki są zbyt mocno wybarwione jodyną, co czyni identyfikację trudną, można usunąć nadmiar jodiny stosując reakcję chemiczną redukcji jodiny przez rozpuszczenie małej ilości tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w objętości przeznaczonej do sedymentacji.

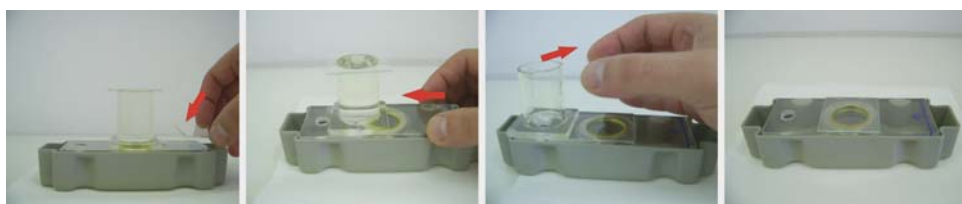
Procedura sedymentacji

- Wybrać komorę i odpowiednią wielkość cylindra, dokładnie oczyścić dno.
- Umieścić cylinder na górze komory centrycznie w stosunku do jej dna. Dociskając jedną ręką cylinder do komory napełnić go próbą i nałożyć pokrywę tak, aby nie powstały pęcherzyki powietrza. Po przykryciu puścić i pozostawić materiał do sedymentacji.



Fot. M. Dubiński

- Po okresie sedymentacji przesunąć ostrożnie cylinder za pomocą szkiełka zakrywającego komorę w celu oddzielenia płynu znad osadu.
- Należy zwrócić uwagę aby nie pozostawić bąbelków powietrza w komorze, ponieważ utrudniają późniejszą analizę mikroskopową.



Fot. M. Dubiński

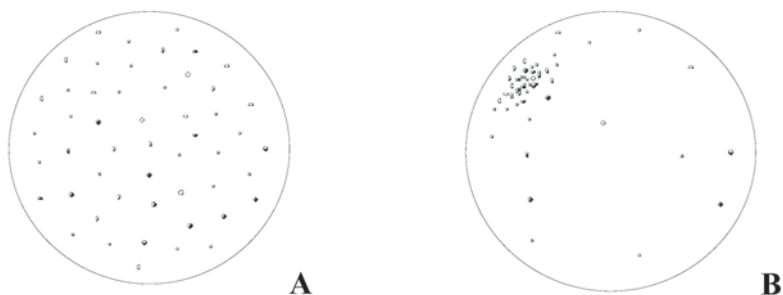
Czyszczenie komór sedymentacyjnych

- Nie wolno dopuścić do wyschnięcia jakiegokolwiek części użytego zestawu do sedymentacji zanim zostanie on poddany dokładnemu oczyszczeniu. Zaschnięty fitoplankton może być bardzo trudny do usunięcia.
- Rozdzielone części zestawu należy najpierw wypłukać bieżącą wodą, a następnie namoczyć przez kilka minut w ciepłej wodzie z dodatkiem detergentu (bez środków polerujących).
- Wyczyścić miękką szczotką lub miękką chusteczką higieniczną, po czym wypłukać bieżącą wodą.

- Komora sedymentacyjna może być również czyszczona przy użyciu 95% etanolu
- Na koniec, należy przepłukać zestaw wodą dejonizowaną lub destylowaną i zostawić do wyschnięcia.
- Należy zwrócić szczególną uwagę, aby nie podrapać dolnej i górnej powierzchni cylindra oraz powierzchni dna komory.

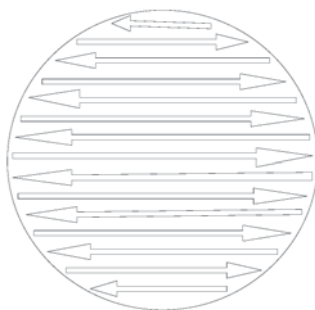
5.3.2. Zliczanie i pomiar organizmów przy użyciu mikroskopu odwróconego

- W celu zaoszczędzenia czasu i uzyskania dobrej dokładności liczenia należy obejrzeć próbę po sedymentacji sprawdzając ogólne ułożenie oraz zagęszczenie komórek na dnie komory. W tym celu należy stosować małe powiększenie (np. obiektyw 4x). Mamy wówczas podgląd większej części dna komory.
- Jeśli wizualna kontrola wykazuje, że rozkład jest nierówny/jednostronny lub w postaci grzbietów i dolin (rys. 1), co wskazuje na prądy konwekcyjne lub wibracje, to należy próbę wylać, oczyścić kolumnę i komorę, a następnie powtórzyć procedurę sedymentacji. Jeśli powyższe zjawisko powtarza się stale, to należy podjąć działania w celu wyeliminowania źródeł zakłóceń.



Rys. 1. Rozłożony materiał na dnie komory po sedymentacji : A – dobrze rozłożony materiał; B – źle rozłożony materiał

- Zalecanym sposobem analizy mikroskopowej dna komory są tzw. „pasy równoległe” (rys. 2). Mamy wówczas pewność przejrzenia całej powierzchni dna.



Rys. 2. Pasy równoległe

- Znalezione taksony należy policzyć, zmierzyć i zapisać do uprzednio stworzonego protokołu (zał. 2), w którym powinny znajdować się również następujące dane: nazwa ppk, data poboru i analizy, używany obiektów i objętość sedymentowana.
- Do każdej próby stosujemy dwa rodzaje powiększeń, zatem potrzebujemy stworzyć również dwa protokoły.
- Zliczane taksony powinny być uszeregowane w klasach wielkości, co jest niezbędne do późniejszego obliczenia objętości i ostatecznie masy węgla. W zależności od wielkości komórek stosuje się odpowiednio różne powiększenia (tab. 3). Przy użyciu powiększenia 100 x (obiektyw 10 x) zliczamy organizmy, które mają rozmiary większe niż 20 μm , a przy użyciu powiększenia 400 x (obiektyw 40 x) zliczamy organizmy o rozmiarach mniejszych niż 20 μm .

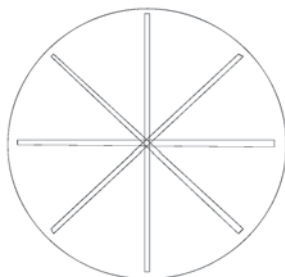
Tabela 3. Zalecane, zestawy obiektów i okularów przeznaczone do liczenia różnych rozmiarów komórek fitoplanktonu

Klasy wielkości	Powiększenie
0,2–2 μm (pikoplankton)*	1000 x
2–20 μm (nanoplankton)	100–400 x
>20 μm (mikroplankton)	100 x

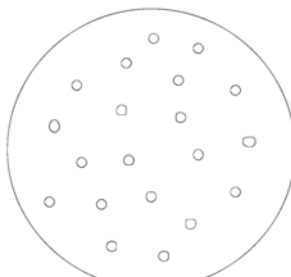
* Powiększenie 1000 x nie jest zalecane przy analizach za pomocą komór sedymentacyjnych Utermöhl

- Ilość przejranych pól widzenia jest ważna ze względu na późniejsze przeliczenie jednostek taksonomicznych na objętość wody.
- Każdy takson liczymy tak długo, aż jego ilość wyniesie 50 osobników, wówczas przerywamy jego liczenie i zapisujemy aktualną ilość przejranych pól widzenia. Następnie kontynuujemy liczenie pozostałych taksonów, aż suma wszystkich wyniesie 500 osobników.
- Taksony występujące jedynie w próbach jakościowych nie bierze się pod uwagę.

Poniższe sposoby analiz dna komory sedymentacyjnej stosuje się w celu uzyskania ogólnego poglądu na ilość organizmów w próbce, określenia taksonów dominujących czy występowania gatunków toksycznych, w zależności od celu badań (rys. 3 i 4).



Rys. 3. Pasy skośne



Rys. 4. Pola losowe

Podczas zliczania zalecane są następujące jednostki:

KOMÓRKA: Wszystkie nie tworzące kolonii gatunki jednokomórkowe

Dinobryon

Aulacoseira

Chaetoceros

Detonula

Leptocylindrus

Melosira

Skeletonema (i inne okrzemki tworzące łańcuchy)

Planktonema (i inne zielenice nitkowate)

Uroglena (niepełne kolonie)

KOLONIA: *Aphanothece*

Coelomoron

Coelosphaerium

Cyanodictyon

Cyanonephron

Gloeotrichia

Gomphosphaeria

Halosphaera

Lemmermanniella

Microcystis (włącznie z *Aphanocapsa*)

Phaecystis

Radiocystis

Snowella

Sphaerocystis (i podobne rodzaje)

Uroglena (kolonie dobrze zachowane)

Woronichinia

CENOBIUM z +/- stałą liczbą komórek (n):

Coelastrum (8, 16)

Crucigenia (4)

Eudorina (32)

Micractinium (4)

Pandorina (16)

Pediastrum (4, 8, 16, 32, etc.)

Scenedesmus (2, 4, 8)

NIEKTÓRE KOLONIE GLONOWE najłatwiej liczyć w grupach 4 komórek, np.:

Chroococcus

Crucigeniella

Dictyosphaerium

Merismopedia

NITKI

Achroonema
Anabaena
Anabaenopsis
Aphanizomenon
Beggiatoa
Nodularia
Oscillatoria
Planktolyngbya
Planktothrix
Pseudanabaena
 (inne sinice nitkowate)

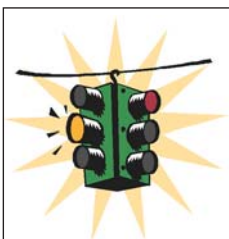
- Nitki o długości 100 mm przyjmuje się jako 1 jednostkę.

KOLONIE JEDNOLITE:

- Policz liczbę komórek w np. $\frac{1}{4}$ kolonii.
- Przemnóż przez 4.

KOLONIE NIEJEDNOLITE:

- Podziel na mniejsze obszary.
- Policz liczbę komórek w jednym obszarze.
- Pomnóż przez liczbę mniejszych obszarów.



Małe gatunki mikroplanktonowe mogą być liczone razem z nanoplanktonem, jeżeli występują licznie, lub też mogą być liczone przy pomocy obiektywu o średnim powiększeniu 200 x. Siatka o wymiarach 5 x 5 kwadratów w jednym z okularów jest bardzo pomocna podczas liczenia pól gęsto pokrytych małymi komórkami. Dokładne zliczanie frakcji pikoplanktonowej jest możliwe przy zastosowaniu mikroskopii fluoroscencyjnej.

6. Obliczenia i wyniki

6.1. Liczebność

Liczba policzonych jednostek w dm^3 wody morskiej jest obliczana jako iloczyn liczby jednostek policzonych i współczynnika C, który kalkulowany jest z następujących równań:

$$C \cdot \text{dm}^{-3} = A \cdot 1000/N \cdot a_1 \cdot V \quad \text{lub} \quad C \cdot \text{dm}^{-3} = A \cdot 1000/a_2 \cdot V$$

gdzie:

A = powierzchnia przekroju cylindra zestawu do sedymentacji; z reguły wewnętrzna średnica wynosi 25 mm, co daje wartość $A = 491 \text{ mm}^2$ (wewnętrzna średnica dna komory jest bez znaczenia)

N = liczba policzonych obszarów lub przekrojów

a_1 = powierzchnia pojedynczego obszaru lub przekroju

a_2 = całkowita policzona powierzchnia

V = objętość (cm^3) poddana sedymentacji

6.2. Biomasa

Wobec dużej zmienności wielkości komórek glonów ich liczba nie obrazuje dostatecznie ich biomasy.

W zależności od celu prowadzonych badań, biomasa fitoplanktonu może być wyrażona jako:

- Objętość komórkowa (waga) – Przeliczenie na objętość komórkową jest zależne od pomiarów wielkości taksonu. W niektórych przypadkach kształty komórek są bardzo skomplikowane i niezbędne jest obliczanie objętości dużej ilości brył geometrycznych.
- Objętość plazmy – przeliczenie objętości komórkowej na objętość plazmy uwzględnia objętość wakuoli.
- Zawartość węgla w komórce – obliczanie opiera się na objętości plazmy.
- Przyjmuje się wartość biomasy jako sumę objętości komórkowej (bio-objętość) gdzie: $1 \mu\text{m}^3 = 1 \mu\text{g}$

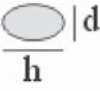
Poniżej zalecane formuły stanowią postęp w kierunku bardziej jednolitego traktowania liczonych organizmów, w celu otrzymania porównywalnych wyników z różnych części Bałtyku (Edler 1979).

6.2.1. Objętość komórkowa

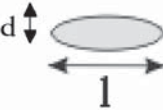
Zestawienie objętości poszczególnych taksonów bałtyckich i ich klasy wielkości, stworzone dzięki wieloletnim badaniom grupy HELCOM PEG, znajdują się na stronie internetowej: <http://www.helcom.fi/stc/files/Publications/Proceedings/bsep106.pdf> lub http://www.helcom.fi/stc/files/Publications/Proceedings/bsep106ANNEX1Biovolumes_web.xls.

W przypadku braku na powyższej liście znalezionej taksonu, należy obliczyć jego objętość za pomocą brył geometrycznych odpowiadających jego kształtowi. Poniżej podano wzory (1–16) na obliczanie objętości brył oraz ich zestawy przypisane poszczególnym taksonom (Hutorowicz 2005).

1)  kula: $V = \frac{\pi \cdot d^3}{6}$

2)  elipsoida: $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot h}{6}$

3)  wałek kołowy (nić): $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot l}{4}$

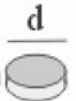
4)  wrzeciono: $V = \frac{2 \cdot \pi \cdot d^2 \cdot l}{15}$

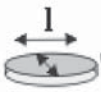
5)  (kolonia komórek w domkach)

elipsoida + stożek: $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot l}{6} + \frac{\pi \cdot d_d^2 \cdot l_d}{12} - \frac{\pi \cdot (d_d - 2)^2 \cdot l_d}{12}$

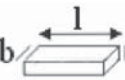
a)  elipsoida + stożek + wałek:

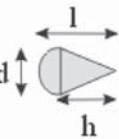
$$V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot l}{6} + \frac{\pi \cdot d_{dm}^2 \cdot \left(\frac{l_{dm}}{3}\right)}{12} - \frac{\pi \cdot (d_{dm} - 2)^2 \cdot \left(\frac{l_{dm}}{3}\right)}{12} + \frac{\pi \cdot d_{dm}^2 \cdot \left(\frac{2}{3} \cdot l_{dm}\right)}{4} - \frac{\pi \cdot (d_{dm} - 2)^2 \cdot \left(\frac{2}{3} \cdot l_{dm}\right)}{4}$$

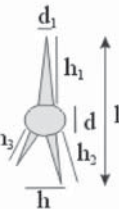
6)  krążek: $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot h}{4}$

7)  eliptyczny wałek: $V = \frac{\pi \cdot d \cdot l \cdot h}{4}$

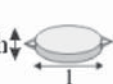
8)  kształt „piszczeli”: $V = b^2 \cdot (l - [2 \cdot d]) \cdot \frac{\pi \cdot d^2 \cdot h}{4}$

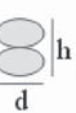
9)  prostopadłościan: $V = l \cdot b \cdot h$

10)  półkula + stożek: $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot (h + d)}{12}$

11)  elipsoida + 3 stożki: $V = \frac{\pi \cdot (d_1^2 \cdot h_1 + d_2^2 \cdot h_2 + d_3^2 \cdot h_3)}{12} + \frac{\pi \cdot d^2 \cdot h}{6}$

12)  elipsoida w kształcie „podkowy”: $V = \frac{\pi \cdot d^2 \cdot l}{6}$

13)  cenobium w kształcie krążka: $V = \frac{\pi \cdot l^2 \cdot h}{4}$

14)  dwie elipsoidy: $V = \frac{2 \cdot \pi \cdot \left(\frac{h}{2}\right)^2 \cdot d}{6}$

15)  dwa stożki ścięte o polu podstaw P_1 i P_2 z 4 lub 6 = N walcowatymi ramionami: $P_1 = \left(\frac{\pi \cdot d^2}{4}\right); P_2 = \left(\frac{\pi \cdot d_{istm}^2}{4}\right); V = \frac{l \cdot (P_1 + \sqrt{P_1 + P_2} + P_2)}{6} + \frac{N \cdot \pi \cdot d_1^2 \cdot l_1}{4}$

16)  dwa stożki ścięte o polu podstaw P_1 i P_2 : $P_1 = \left(\frac{\pi \cdot d^2}{4}\right); P_2 = \left(\frac{\pi \cdot d_{istm}^2}{4}\right); V = \frac{l \cdot (P_1 + \sqrt{P_1 + P_2} + P_2)}{6}$

gdzie: V – objętość, d – średnica, l – długość, h – wysokość

CYANOBACTERIA

<i>Aphanocapsa</i> :	kula
<i>Aphanothece</i> :	elipsoida
<i>Achroonema</i> :	walec
<i>Anabaena</i> :	walec
<i>Aphanizomenon</i> :	walec (liczba nitek o dł. 100 mm)
<i>Chroococcales</i> :	komórki jako kule; dzielące się komórki jako kule/2
<i>Gomphosphaeria</i> :	komórki jako kule, elipsoidy lub stożki ścięte
<i>Snowella</i> :	komórki jako kule, elipsoidy lub stożki ścięte
<i>Woronichinia</i> :	komórki jako kule, elipsoidy lub stożki ścięte
<i>Lemmermanniella</i> :	komórki jako kule, elipsoidy lub stożki ścięte
<i>Cyanodictyon</i> :	komórki jako kule, elipsoidy lub stożki ścięte
<i>Planktolyngbya limnetica</i> :	walec
<i>Merismopedia</i> :	komórki jako kule; dzielące się komórki jako kule/2
<i>Microcystis</i> :	komórki jako kule (por. Reynolds i Jaworski, 1978)
<i>Nodularia</i> :	walec
<i>Oscillatoria</i> :	walec
<i>Phormidium</i> :	walec
<i>Pseudoanabaena</i> :	walec
<i>Planktothria</i> :	walec

CRYPTOPHYCEAE

<i>Chilomonas</i> :	stożek + kula/2, elipsoida obrotowa (o przekroju elipsy)
<i>Chroomonas</i> :	stożek + kula/2, elipsoida obrotowa (o przekroju elipsy)
<i>Cryptomonas</i> :	elipsoida obrotowa (o przekroju elipsy)
<i>Rhodomonas</i> :	stożek + kula/2
<i>Hemiselmis</i> :	elipsoida
<i>Teleaulax</i> :	stożek + kula/2
<i>Plagioselmis</i> :	stożek + kula/2

DINOPHYCEAE

<i>Amphidinium</i> :	elipsoida obrotowa $\cdot 2/3$ (o przekroju elipsy) lub 2 stożki
<i>Ceratium furca</i> :	stożek + prostopadłościan + trapezoid + walec
<i>C. lineatum</i> :	stożek + prostopadłościan + trapezoid + walec
<i>C. fusus</i> :	walec + stożek ścięty
<i>C. longipes</i> :	stożek + walec + kula/2
<i>C. macroceros</i> :	stożek + walec + kula/2
<i>C. tripos</i> :	stożek + walec + kula/2
<i>Cochlodinium</i> :	elipsoida obrotowa
<i>Dinophysis acuminata</i> :	elipsoida
<i>D. norvegica</i> :	2 stożki ścięte – 50%
<i>D. rotundata</i> :	walec
<i>D. acuta</i> :	elipsoida
<i>Ebria</i> :	kula/2–30%.
<i>Glenodinium</i> :	kula – 10 do 40%
<i>Perdiniella catenata</i> :	kula/2
<i>Amylax triacantha</i> :	trapezoid + prostopadłościan/2
<i>Gonyaulax</i> :	kula – 10 do 40%
<i>Goniodoma</i> :	kula

<i>Gymnodinium:</i>	2 stożki lub 2 kule/2 – 10 do 40%
<i>Gyrodinium:</i>	2 stożki lub 2 kule/2 – 10 do 40%
<i>G. simplex:</i>	kula – 10%
<i>G. splendens:</i>	kula/2 + stożek/2
<i>Heterocapsa triquetra:</i>	2 stożki – 20%
<i>Protoperidinium bipes:</i>	trapezoid + stożek/2 lub stożek – 50%
<i>Noctiluca miliaris:</i>	kula – 10–20%
<i>Oxytoxum:</i>	2 stożki
<i>Polykrikos:</i>	walec – 10%
<i>Prorocentrum balticum:</i>	kula – 10%; (należy wykonać pomiar maksymalnej średnicy)
<i>P. minimum:</i>	stożek – 10 do 20%
<i>P. micans:</i>	elipsoida obrotowa
<i>Protoperidinium:</i>	ogólne formuły do obliczenia objętości: stożek + kula/2, 2 stożki, kula, 2 stożki + stożek. (ogólnie objętości muszą być pomniejszone o 10 do 30% z powodu wklęsłości na stronie brzusznej)
<i>P. breve:</i>	stożek + kula/2
<i>P. brevipes:</i>	stożek + kula/2
<i>P. conicoides:</i>	stożek + kula/2
<i>P. steinii:</i>	stożek + kula/2
<i>P. claudicans:</i>	(stożek + 2 stożki) – 30%
<i>P. conicum:</i>	(stożek + 2 stożki) – 25%
<i>P. depressum:</i>	(stożek + 2 stożki) – 40%
<i>P. divergens:</i>	(stożek + 2 stożki) – 30%
<i>P. granii:</i>	(stożek + kula/2) – 20%
<i>P. pallidum:</i>	(stożek + kula/2) – 20 do 30%
<i>P. pellucidum:</i>	(stożek + kula/2) – 20 do 30%
<i>Scrippsiella:</i>	kula – 10 do 40% lub 1/2 kuli + stożek
<i>Warnowia:</i>	elipsoida obrotowa

CHRYSTOPHYCEAE

<i>Bicocoecca:</i>	elipsoida obrotowa lub kula
<i>Dinobryon:</i>	elipsoida obrotowa lub kula
<i>Kephyrion:</i>	elipsoida obrotowa lub kula
<i>Dictyocha:</i>	kula/2
<i>Mallomonas:</i>	stożek + kula/2 lub elipsoida
<i>Synura:</i>	stożek + kula/2
<i>Uroglena:</i>	kula lub elipsoida obrotowa
<i>Uroglenopsis:</i>	kula lub elipsoida obrotowa

BACILLARIOPHYCEAE

<i>Achnanthes:</i>	prostopadłościan
<i>Actinocyclus:</i>	walec
<i>Amphiprora:</i>	elipsoida
<i>Amphora:</i>	elipsoida
<i>Asterionella:</i>	prostopadłościan
<i>Attheya:</i>	walec
<i>Bacillaria:</i>	prostopadłościan
<i>Biddulphia:</i>	walec – 20 do 30%
<i>Cerataulina:</i>	walec
<i>Chaetoceros:</i>	elipsoida

<i>Cocconeis</i> :	elipsoida
<i>Coscinodiscus</i> :	walec
<i>Cymbella</i> :	elipsoida
<i>Dactyliosolen</i> :	walec
<i>Detonula</i> :	walec
<i>Diatoma</i> :	prostopadłościan
<i>Diploneis</i> :	elipsoida
<i>Ditylum</i> :	walec
<i>Epithemia</i> :	elipsoida
<i>Eunotia</i> :	elipsoida
<i>Fragilaria</i> :	prostopadłościan
<i>Gomphonema</i> :	elipsoida
<i>Grammatophora</i> :	prostopadłościan
<i>Guinardia</i> :	walec
<i>Gyrosigma</i> :	elipsoida – 10%
<i>Hantzschia</i> :	prostopadłościan
<i>Lauderia</i> :	walec
<i>Leptocylindrus</i> :	walec
<i>Licmophora</i> :	prostopadłościan/2
<i>Melosira</i> :	walec
<i>Navicula</i> :	prostopadłościan, prostopadłościan/2
<i>Nitzschia</i> :	prostopadłościan, prostopadłościan/2
<i>Pinnularia</i> :	prostopadłościan, prostopadłościan/2
<i>Porosira</i> :	walec
<i>Rhabdonema</i> :	prostopadłościan
<i>Rhizosolenia</i> :	walec
<i>Rhoicosphenia</i> :	prostopadłościan/2
<i>Rhopalodia</i> :	elipsoida
<i>Skeletonema</i> :	walec
<i>Stephanodiscus</i> :	walec
<i>Surirella</i> :	elipsoida
<i>Synedra</i> :	prostopadłościan, prostopadłościan/2
<i>Tabellaria</i> :	prostopadłościan
<i>Thalassionema</i> :	prostopadłościan
<i>Thalassiosira</i> :	walec

XANTHOPHYCEAE

<i>Centritractus</i> :	elipsoida obrotowa
<i>Gloeochloris</i> :	komórki jako kule lub elipsoida obrotowa
<i>Ophiocytium</i> :	walec

EUGLENOPHYCEAE

<i>Colacium</i> :	elipsoida obrotowa
<i>Euglena</i> :	walec + stożek, stożek lub elipsoida obrotowa
<i>Eutreptia</i> :	walec + stożek, stożek lub elipsoida obrotowa
<i>Eutreptiella</i> :	walec + stożek, stożek lub elipsoida obrotowa
<i>Trachelomonas</i> :	walec + stożek, stożek lub elipsoida obrotowa

PRASINOPHYCEAE

<i>Pyramimonas</i> :	trapezoid
----------------------	-----------

CHLOROPHYCEAE

<i>Ankistrodesmus</i> :	stożek + stożek
<i>Carteria</i> :	kula lub elipsoida obrotowa
<i>Chlamydomonas</i> :	kula lub elipsoida obrotowa
<i>Chlorella</i> :	kula
<i>Chlorogonium</i> :	stożek + stożek
<i>Dichyosphaerium</i> :	komórki jako kule
<i>Golenkinia</i> :	kula
<i>Kirchneriella</i> :	stożek + stożek lub elipsoida obrotowa
<i>Monoraphidium</i> :	stożek + stożek lub elipsoida obrotowa
<i>Oocystis</i> :	elipsoida obrotowa
<i>Pediastrum</i> :	walec o wysokości równej długości najkrótszej ściany komórki znajdującej się w środku cenobium
<i>Planctonema</i> :	walec
<i>Scenedesmus</i> :	komórki jako elipsoidy obrotowe lub stożek + stożek

ORZĘSKI Z GLONAMI ENDOSYMBIOTYCZNYMI

<i>Mesodinium</i> :	< 30 µm: 2 kule
	> 30 µm: kula

PIKOPLANKTON	< 2 mm
--------------	--------

CHOANOFLAGELLIDA

<i>Acanthoecca</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Acanthoecopsis</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Calliakantha</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Crinolina</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Desmarella</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Diaphanoeca</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Diplothea</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Monosiga</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Parvicorbicula</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Pleurasiga</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Salpingoeca</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Saroeca</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Stephanoeca</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule
<i>Savillea</i> :	elipsoidy obrotowe lub kule

6.2.2. Obliczenia objętości plazmy

(Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM. Annex 6 za Edler 1979)

Dla wszystkich organizmy fitoplanktonowych, oprócz okrzemek

W niniejszym zaleceniu zakłada się, że objętość plazmy (ang. *plasma volume*, *PV*) równa jest objętości komórki (ang. *cell volume*, *CV*).

$$PV = CV$$

Jednostka: µm³

Dla okrzemek

Różne metody obliczania objętości plazmy były proponowane przez takich autorów jak, Smayda (1965) i Strathmann (1967). Metoda zalecana poniżej jest zmodyfikowaną wersją metody Strathmanna; modyfikacja pozwala na włączenie okrzemek Pennatae. Objętość plazmy (PV) równa jest objętości komórki (CV) minus objętość wakuoli (ang. *vacuole volume*, *VV*).

Objętość wakuoli jest obliczana przez odjęcie grubości plazmy (*c*) od pomiarów długości, szerokości. Jeżeli pomiar to odległość od ściany do ściany komórkowej to należy odjąć 2 *c* od zmierzonej wartości. Jeśli stosowany jest pomiar taki jak, średnica nieobjęta ścianą komórkową, a więc zawierająca tylko jedną warstwę plazmy, to odejmujemy tylko jedną wartość *c*. Wartości *c* zostały podane przez Lohmanna (1908) i Smaydę (1965); zawierają się w zakresie 1 μm .

Z powodu dużej zawartości materii organicznej w wakuoli należy od objętości komórkowej odjąć tylko 90% objętości wakuoli, aby uzyskać objętość plazmy.

$$PV = CV - (0,9 \cdot VV)$$

Jednostka: mm^3

$$\text{Objętość komórkowa [CV]} = (d^2 \cdot h)/4$$

$$\text{Objętość wakuoli [VV]} = (d-2c)^2 \cdot (h-2c)/4$$

$$\text{Objętość plazmy [PV]} = CV - (0,9 \cdot VV)$$

6.2.3. Obliczanie zawartości węgla

Od 2000 roku rekomendowaną metodą obliczania zawartości węgla w komórkach organizmów fitoplanktonowych są formuły opracowane przez Menden-Deuer and Lessard (2000), które pomijają konieczność dodatkowego obliczania objętości plazmy. Stworzono dwa wzory, z których jeden dotyczy wyłącznie okrzemek ze względu na obniżoną zawartość węgla w tej grupie.

Wzór ogólny

$$\text{Węgiel [pg C} \cdot \text{cell}^{-1}] = 0,216 \times CV^{0,939}$$

Dla okrzemek

$$\text{Węgiel [pg C} \cdot \text{cell}^{-1}] = 0,288 \times CV^{0,811}$$

6.4. Wyniki

Na podstawie otrzymanych wyników tworzymy raport końcowy z analizowanej próby (zał. 3). Ważne jest aby wszystkie otrzymane wyniki zapisywane były w ustalonych jednostkach, ponieważ wówczas istnieje możliwość porównywania danych otrzymanych z różnych rejonów badań.

7. Analiza półilościowa

Oznaczenia mikroskopowe to jedyna metoda, za pomocą której można uzyskać informacje na temat składu gatunkowego prób fitoplanktonu. Ta informacja jest niezbędna w celu wykrycia zmian w zespołach fitoplanktonowych, zachodzących w czasie i przestrzeni. Liczenie komórek pochłania wiele czasu i w przypadku, gdy głównie potrzebne są informacje o składzie gatunkowym fitoplanktonu (przekroje ze statków nie badawczych, dodatkowe próby z kolumny wody), można zastosować metodę pół-ilościową zamiast metody ilościowej. W metodzie pół-ilościowej oznaczane i rejestrowane są wszystkie grupy taksonomiczne, ale ich liczebność jest wyznaczana przez pół-ilościowe uporządkowanie/uszeregowanie (HELCOM za Leppanen i in., 1995).

Liczenie

Do analizy stosowany jest mikroskop odwrócony. Przynajmniej połowa dna komory powinna być poddana obserwacji przy użyciu małego powiększenia (okular 10x), natomiast 2 dolne przekroje – przy użyciu wyższego powiększenia (okular 40x). Wszystkie znalezione gatunki powinny być zapisane, z opcją siatki, a więc podczas zapisywania otrzymują one automatycznie najniższe zaszeregowanie. Uporządkowanie pół-ilościowe powinno być przeprowadzone przy użyciu skali od 1 do 5. Uporządkowanie jest zależne od próby, i kilka gatunków może uzyskać takie samo zaszeregowanie, nawet to najwyższe.

- bardzo nieliczny; jedna lub kilka (< 5 we frakcji $> 20 \mu\text{m}$) jednostek w analizowanym obszarze = w próbie po sedymentacji
- nieliczny; nieco więcej komórek lub jednostek w analizowanym obszarze
- rozproszony; niezależnie od powiększenia występuje kilkanaście komórek lub jednostek w wielu polach widzenia
- liczny; niezależnie od powiększenia występuje kilkanaście komórek lub jednostek w większości pól widzenia
- dominujący; niezależnie od powiększenia występuje wiele komórek lub jednostek w każdym polu widzenia

Jeśli niezbędne jest policzenie dokładnej liczebności gatunku (np. gatunku potencjalnie toksycznego), to należy dokonać analizy co najmniej 20 obszarów (z obiektywem 40x) lub jednego przekroju średnicowego (z obiektywem 10x).

8. Literatura

- Edler L.(ed.) (1979) Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. National Swedish Environment Protection Board. 1–38.
- Gentile J. H. 1971. Blue-green and green algal toxins. [w]: Kadis S., Ciegler A. Ajl S.J. (red). Microbial toxins. Vol. 7:27–66.

- Hasle G.R., 1978. The inverted microscope method. In: Sournia A. (ed.) *Phytoplankton manual*. UNESCO Monogr. Oceanogr. Method. 6: 88–96.
http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/AnnexesC/en_GB/annex6/
<http://www.helcom.fi/stc/files/Publications/Proceedings/bsepl06.pdf>
http://www.helcom.fi/stc/files/Publications/Proceedings/bsepl06ANNEX1Biovolumes_web.xls
- Hutorowicz A. 2005. Opracowanie standardowych objętości komórek do szacowania biomasy wybranych taksonów glonów planktonowych wraz z określeniem sposobu pomiarów i szacowania. Olsztyn. Maszynopis.
- Leppänen J.-M., Rantajärvi E., Hällfors S., Kruskopf M., Laine V., 1995:. Unattended monitoring of potentially toxic phytoplankton species in the Baltic Sea. *Journal of Plankton Research* 17: 891–902.
- Lohmann H., 1908. Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton. *Wiss. Meeresunters., Abt. Kiel*, 10: 129–370.
- Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM. Annex 6: Guidelines concerning phytoplankton species composition, abundance and biomass.
- Menden-Deuer S., Lessard E.J., 2000. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.* 45: 569–579.
- Nauwerck A., 1963. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Symb. Bot. Ups.* 17(5): 1–163.
- Nebaeus M. 1984. Algal water-blooms under ice-cover. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 719–724.
- Reynolds C.S. 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge, s. 384.
- Rott E., 1981. Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. S. Hydrol.* 43: 34–62.
- Smayda T.J.: A quantitative analysis of the phytoplankton of the Gulf of Panama II. On the relationship between C^{14} assimilation and the diatom standing crop. *Inter-Am. Trop. Tuna Comm. Bull.* 9, 466–531 (1965).
- Strathmann R.R. 1967: Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. - *Limnol. And Oceanogr.* 12: 411–418.
- Utermöhl H. 1958: Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. – *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 9: 1–38.
- Venrick, E.L., 1978a. The implications of subsampling. In: Soumia, A. (ed.): *Phytoplankton manual*. UNESCO Monogr. Oceanogr. Method. 6: 75–87.
- Venrick, E.L., 1978b. How many cells to count? In: Soumia, A. (ed.): *Phytoplankton manual*. UNESCO Monogr. Oceanogr. Method. 6: 167–180.
- Willén, T., 1962. Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. *Oikos*. 13: 169–199.

Załącznik 1

KARTA POBORU PRÓB FITOPLANKTONOWYCH

Typ wód	
Część wód	
Nazwa JCW	
Oznaczenie ppk	
Szerokość geograficzna ppk	
Długość geograficzna ppk	
Głębokość stacji	
Data poboru	
Godzina poboru	
Głębokość poboru –poziomy: 1 2	
Zasolenie – poziomy: 1 2	
Temperatura wody – poziomy: 1 2	
Przezroczystość wody (krążek Secchiego)	
Przyrząd do poboru	
Substancja konserwująca	
Nazwa jednostki pływającej	
Uwagi	
Osoba wypełniająca	

Załącznik 2

PROTOKÓŁ ANALIZY MIKROSKOPOWEJ FITOPLANKTONU

Data poboru	Nazwa ppk	Powiększenie X	Obj. Sedymetowana	Głębokość	Data analizy
Takson (a)	W tym miejscu zapisujemy kolejno znalezione okazy danego taksonu w przypisanych klasach wielkości, do których wg http://www.helcom.fi/stc/files/Publications/Proceedings/bsep106ANNEX1Biovolumes_web.xls określone są objętości komórkowe lub rozmiarach potrzebnych do wyliczenia objętości brył geometrycznych przypisanych poszczególnym taksonom.				
Takson(b)					
Data poboru	Nazwa ppk	Powiększenie X	Obj. Sedymetowana	Głębokość	Data analizy
Takson (a)					
Takson(b)					

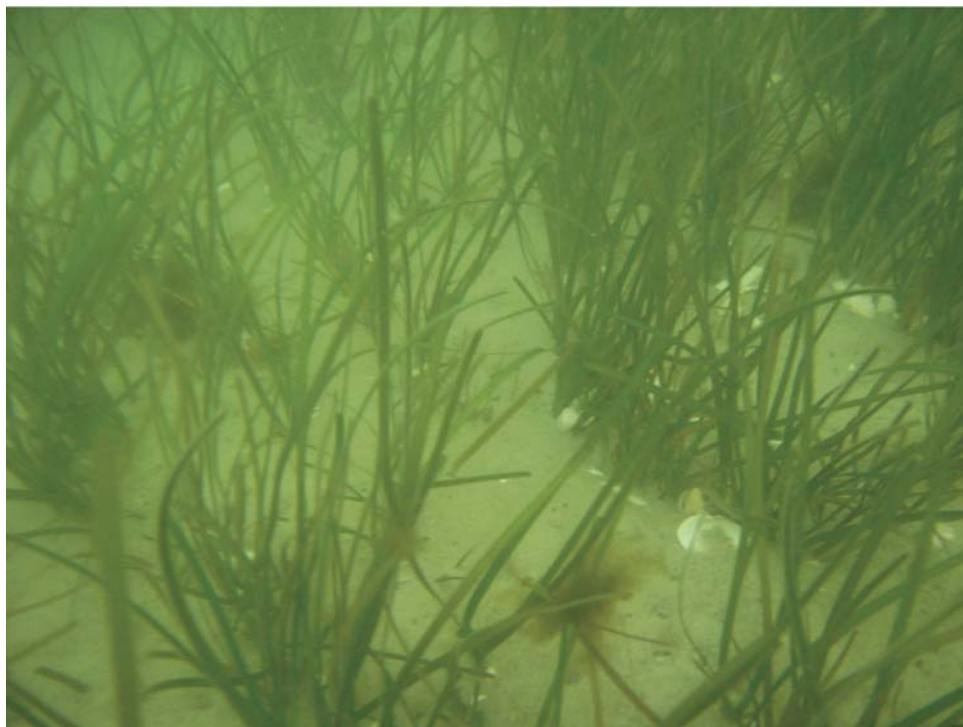
Załącznik 3

PRZYKŁADOWY RAPORT KOŃCOWY Z ANALIZY PRÓBY

[illegible]

PRZEWODNIK METODYCZNY DO BADAŃ TERENOWYCH
I ANALIZ LABORATORYJNYCH FITOPLANKTONU,
INNEJ FLORY WODNEJ I MAKROBEZKRĘGOWCÓW
BENTOSOWYCH W WODACH PRZEJŚCIOWYCH
I PRZYBRZEŻNYCH

MAKROGLONY I OKRYTOZALĄŻKOWE



**Lidia Kruk-Dowgiałło,
Paulina Brzeska, Radosław Opiola, Marek Kuliński**

Spis treści

Wprowadzenie	35
1. Słowniczek pojęć	36
2. Badania środowiskowe	37
2.1. Strategia	38
2.1.1. Personel	38
2.1.2. Termin i częstotliwość badań środowiskowych	39
2.1.3. Warunki utrudniające badania środowiskowe	39
2.2. Sprzęt i przyrządy	39
2.2.1. Sprzęt do poboru prób	39
2.2.2. Sprzęt do wykonania dokumentacji fotograficznej	41
2.2.3. Sprzęt do zabezpieczenia prób	42
2.2.4. Przyrządy i sprzęt do pomiarów i przechowywania prób do analiz parametrów fizykochemicznych	42
2.3. Przygotowanie przyrządów i sprzętu do poboru prób	43
2.4. Postępowanie na jednostce pływającej	43
2.5. Pomiary i pobór prób	44
2.5.1. Pomiary parametrów fizykochemicznych	44
2.5.2. Badania pośrednie	44
2.5.3. Badania bezpośrednie	45
2.6. Procedura postępowania z pobranymi próbkami na pokładzie	47
2.6.1. Zabezpieczenie prób przed zmianą składu i właściwości	47
2.6.2. Wypełnianie karty poboru prób	48
2.7. Przekazanie prób do laboratorium	48
2.8. Konserwowanie i przechowywanie prób makrofitów	49
3. Analizy laboratoryjne prób makrofitów	49
3.1. Personel	49
3.2. Aparatura i sprzęt	49
3.3. Przygotowanie próby do analiz	50
3.4. Analiza jakościowa	50
3.5. Wykonanie i przechowywanie materiałów zielnikowych	51
3.6. Analiza ilościowa	52
Literatura	54
Załączniki	56

Wprowadzenie

W Ramowej Dyrektywie Wodnej (RDW) UE, obowiązującej w Polsce od 2004 roku, do oceny stanu jakości ekologicznej wód, jako wskaźnik włączono poza fitoplanktonem tzw. inne rośliny tj. rośliny bentalu – makrofity, które podzielono na makroglony Thallophyta oraz okrytozalążkowe Angiospermae (EU WFD 2000). Ocenę stanu na podstawie makrofitytów można przeprowadzać w tych częściach wód, gdzie stwierdzono ich występowanie.

Rozwój makrofitytów zależy od warunków fizykochemicznych w toni wodnej (temperatura, zasolenie, przezroczystość, koncentracja substancji biogenicznych) i w osadach dennych (rodzaj podłoża, odczyn, warunki oksydacyjno-redukcyjne, zawartość substancji biogenicznych).

Makrofity reagują na następujące rodzaje presji: zmianę dopływu ładunku substancji biogenicznych i koncentracji zawiesiny, zmiany struktury dna oraz warunków fizykochemicznych osadów dennych.

Do głównych zalet makrofitytów, jako wskaźników zmian środowiska, należą:

- wrażliwość na zmianę warunków środowiskowych,
- zmienność wieloletnia wskazująca na zmiany stanu środowiska,
- zmienność wskazująca pośrednio na zmiany zachodzące w innych elementach jakości ekologicznej (np. w makrozoobentosie oraz ichtiofaunie).

Badanie makrofitytów wymaga:

- zlokalizowania rejonów ich występowania,
- specjalistycznego sprzętu i przyrządów,
- przeszkolonego personelu w celu zapewnienia procedury jakości,
- wykwalifikowanych pływonurków z uprawnieniami (przy poborze bezpośrednim prób),
- przestrzegania odpowiednich przepisów i procedur bezpieczeństwa.

Celem przewodnika jest przedstawienie procedur postępowania przy badaniu makrofitytów tj. przy poborze prób oraz ich analizie laboratoryjnej i przygotowaniu wyników do bazy danych.

Procedury umożliwią różnym ośrodkom prowadzenie badań ujednoliconymi metodami.

Procedury opracowano zgodnie z wytycznymi Ramowej Dyrektywy Wodnej, z uwzględnieniem specyfiki warunków środowiskowych polskiej strefy przybrzeżnej (Kruk-Dowgiałło, 2000a i b, Kruk-Dowgiałło i Opióła, 2001, Kruk-Dowgiałło i in. 2007, Klusek i in., 2003, Andruliewicz i in., 2004, Osowiecki i Kruk-Dowgiałło 2006, Osowiecki i Kruk-Dowgiałło, 2007, Pliński i in., 1978, Pliński, 1995 i 2005),

w oparciu o metody badań stosowane w innych krajach (Kenneth i Kershaw, 1973, Hällsfors i in., 1987, Kautsky, 1993 i 1995) oraz w oparciu o procedury monitoringu makrofitytów HELCOM COMBINE (Bäck, 1999).

Ze względu na specyfikę warunków środowiskowych poszczególnych typów wód (Krzymiński i in., 2004, Krzymiński i Kruk-Dowgiałło, 2005) w polskich obszarach morskich, podzielono je na dwie następujące grupy:

- typ wód TWI – Lagunowy z substratem mułowym i piaszczystym, a zatem i jego części wód tj. Zalew Wiślany, Zalew Szczeciński i Zalew Kamieński,
- typy wód:
 - TWII – Zalewowy z substratem mulistym i piaszczystym,
 - TWIII – Zatokowy z substratem ilasto-mulistym,
 - TWIV – Zatokowy z substratem piaszczystym okresowo stratyfikowany,
 - TWV – Ujściowy z substratem piaszczystym,
 - CWI – Mierzejowy,
 - CWII – Otwarte wybrzeże z klifami i substratem piaszczystym,
 - CWIII – Otwarte wybrzeże z substratem piaszczystym i brzegiem wydumowym.

Dla każdej z tych grup typów wód opracowano odrębne metody badań środowiskowych (rozdz. 2).

Wybór rejonów i punktów pomiarowo-kontrolnych (ppk) w poszczególnych jednolitych częściach wód do badań makrofitytów powinny być oparte na wiedzy o występowaniu makrofitytów w obszarach morskich RP.

W przypadku braku szczegółowych danych dotyczących makrofitytów w danej części wód, należy wykonać badania rozpoznawcze, których celem będzie zidentyfikowanie rejonów występowania makrofitytów oraz wyznaczenie w nich punktów pomiarowo-kontrolnych. Ocenę rozpoznania pod tym względem części wód oraz propozycje badań części wód nierozpoznanych zamieszczono w sprawozdaniu Osowieckiego i in., 2009 oraz w załączniku 7 do tego sprawozdania.

1. Słowniczek pojęć

Gatunek epifityczny – gatunek rozwijający się na podłożu, który stanowią organizmy żywe, tj. inne rośliny lub zwierzęta; np. *Acrochaetium* sp., *Ceramium* spp.

Makrofity, flora denna – świat roślinny dna, na który składają się duże glony (plechowce) – makroglony *Thallophyta* oraz okrytozalążkowe – *Angiospermae*. Rozwijają się wyłącznie w prześwietlonych rejonach wód, co oznacza ograniczenie ich rozmieszczenia wyłącznie do strefy eufotycznej (Żmudziński i in., 2002). Powszechnie używaną w literaturze naukowej zamienną nazwą określającą makrofity jest „fitobentos” (wg RDW fitobentos to glony mikroskopijnych rozmiarów).

Makroglony, makroalgi, *Thallophyta* – przytwierdzające się do twardego podłoża (np. kamieni, drewnianych pali, łodyg i liści roślin wyższych oraz muszli mięczaków)

znajdującego się pod wodą lub nieprzytwierdzone, zalegające na dnie glony wielokomórkowe o budowie plechowej, z grupy zielenic, brunatnic i krasnorostów; zaliczane do nich są między innymi rodzaje *Pilayella*, *Enteromorpha* i *Cladophora* oraz gatunki *Fucus vesiculosus* czy *Furcellaria lumbricalis*, ale również przytwierdzający się do piaszczystego dna nibykorzeniami przedstawiciele ramienic Charales.

Okrytozalążkowe, okrytonasienne, Angiospermae – wodne rośliny kwiatowe żyjące na piaszczystym lub mulistym dnie morskim, przytwierdzone do niego systemem korzeniowym, zwane ryzobentosem, np. *Zostera marina*, gatunki z rodzaju *Potamogeton*.

Punkt pomiarowo-kontrolny (ppk) – miejsce poboru prób i wykonywania pomiarów, monitorowane w celu uzyskania informacji niezbędnych do określenia stanu jakości ekologicznej danej części wód. Punkt pomiarowo-kontrolny opisany jest symbolem oraz współrzędnymi geograficznymi.

Takson – jednostka systematyczna, odrębna pod względem biologicznym, morfologicznym i genetycznym, zaliczana do określonej kategorii systematycznej np. typ, rodzina, rodzaj, gatunek.

2. Badania środowiskowe

Ze względu na warunki środowiskowe w poszczególnych typach wód (a także ich częściach), przede wszystkim na warunki świetlne panujące w toni wodnej i głębokość akwenu, typy wód podzielono na dwie grupy (Wprowadzenie). Z podziału wynikają zalecane dwie następujące metody środowiskowych badań makrofity (tab. 1):

- *pośrednia* – bez udziału pływonurka,
- *bezpośrednia* – z udziałem pływonurka.

W ramach badań monitoringowych w zakresie makroglonów i okrytozalążkowych zbierane są zarówno próby jakościowe jak i ilościowe. W przypadku poboru *bezpośredniego*, dodatkowo przez pływonurka szacowane jest procentowe pokrycie dna przez rośliny w rejonie punktu pomiarowo-kontrolnego oraz wykonywana jest dokumentacja fotograficzna.

W rejonie każdego ppk wyznaczonego do badań makrofity należy wykonać również badania określonych, wspierających parametrów fizykochemicznych w wodzie naddennej oraz w osadach. Z tego względu, że niniejszy przewodnik dotyczy badań makrofity nie opisano w nim szczegółowych procedur poboru i analiz prób fizykochemicznych. W poszczególnych jego rozdziałach uwzględniono tylko ogólnie zapisy ich dotyczące, odwołując się w nich do szczegółowych procedur poboru i analiz prób fizykochemicznych, we właściwych im przewodnikach metodycznych.

Tabela 1. Zróżnicowanie metody środowiskowych badań makrofitów w typach wód w zależności od specyficznych dla nich warunków środowiskowych

Charakterystyka wariantu badań	Badania pośrednie	Badania bezpośrednie
Typy wód	TWI	TWII, TWIII, TWIV, TWV, CWI, CWII, CWIII
Wybrane warunki środowiskowe	(widzialność przy dnie < 2 m, głębokość akwenu < 2 m)	(widzialność przy dnie > 2 m, głębokość akwenu ≥ 2 m)
Miejsce poboru	ppk	ppk
Liczba prób	4 ilościowe i 1 jakościowa	4 ilościowe i 1 jakościowa
Sposób poboru	bez pletwonurka	pletwonurek
Przyrząd poboru	chwytacz Bernatowicza, kotwiczka	DAK
Dokumentacja fotograficzna	niewykonywana	wykonywana
Szacowanie procentowego pokrycia dna przez rośliny	niewykonywane	wykonywane

W niniejszym przewodniku nie uwzględniono również procedur określających warunki bezpieczeństwa pracy pletwonurka, gdyż jest to regulowane odrębnymi przepisami.

2.1. Strategia

2.1.1. Personel

Zaleca się następujący skład zespołu badawczego:

W przypadku badań *pośrednich*:

- pracownik obsługujący przyrządy poboru prób na pokładzie jednostki pływającej,
- pracownik wykonujący czynności związane z wykonaniem pomiarów parametrów fizykochemicznych, z zabezpieczeniem prób na pokładzie jednostki pływającej oraz wypełnieniem kart poboru prób.

W przypadku badań *bezpośrednich*:

- pletwonurek wykonujący pobór prób oraz podwodną dokumentację fotograficzną,

- płetwonurek zabezpieczający pracę płetwonurka pracującego pod wodą,
- pracownik wykonujący czynności związane z wykonaniem pomiarów parametrów fizykochemicznych, z zabezpieczeniem prób na pokładzie jednostki pływającej oraz wypełnieniem kart poboru prób.

2.1.2. Termin i częstotliwość badań środowiskowych

Zarówno badania pośrednie jak i bezpośrednie należy wykonywać, co trzy lata, dwukrotnie w ciągu roku: w czerwcu i we wrześniu.

2.1.3. Warunki utrudniające badania środowiskowe

Zrealizowanie badań środowiskowych w wybranym terminie może być w niektórych warunkach utrudnione, a czasem nawet niemożliwe. W skrajnych przypadkach badania należy przełożyć na inny termin (ale nie na inny miesiąc). Do przyczyn uniemożliwiających środowiskowe badania makrofitów zaliczono:

- dla badań *pośrednich i bezpośrednich*:
 - zbyt duże falowanie – stan morza uniemożliwiający bezpieczną pracę,
 - brak dostępu do punktu pomiarowo-kontrolnego, np. z powodu lokalnie wystawionych sieci rybackich;
- dla badań *bezpośrednich*:
 - mała przezroczystość wynikająca z okresowej mętności wody lub wysokiej turbulencji, np. po sztormie, niedostateczne oświetlenie, nie zaleca się prowadzenia badań wieczorem.

2.2. Sprzęt i przyrządy

2.2.1. Sprzęt do poboru prób

W przypadku badań *pośrednich*:

- chwytacz Bernatowicza (Bernatowicz i Wolny, 1969), (fot. 1), do poboru prób ilościowych; powierzchnia poboru próby 0,16 m²,
- kotwiczka (Bernatowicz i Wolny, 1969), (fot. 2) do poboru prób jakościowych.

W przypadku badań *bezpośrednich*:

- przyrząd DAK (Andrulewicz i in., 2004), (rys. 1) do poboru prób ilościowych, powierzchnia poboru próby – 0,04 m²
- worki siatkowe zakładane na DAK do prób ilościowych – 4 sztuki na punkt pomiarowo-kontrolny,
- worek siatkowy do próby jakościowej – 1 sztuka na punkt pomiarowo-kontrolny,
- worek transportowy (siatkowy) do transportu zebranych prób z możliwością łatwego otwierania i zamykania pod wodą,
- szpachelka – do zeszkrobывania makroglonów z podłoża twardego,

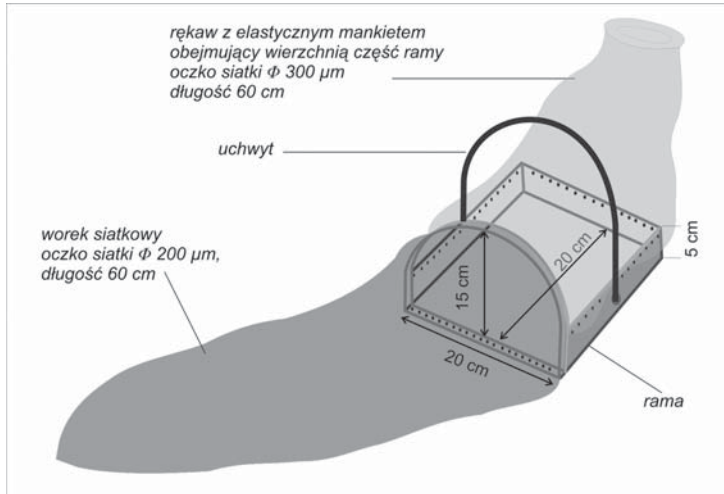
- tabliczka do zapisywania informacji pod wodą z wymiennymi kalkami, na których widnieją tabele (zał. 2), wraz z ołówkiem przyczepionym linką na stałe do tabliczki,
- taśma miernicza.



Fot. 1. Chwytnacz Bernatowicza – przyrząd do pośredniego poboru prób ilościowych makroglonów i okrytozależkowych (fot. Centrum Badań Ekologicznych PAN)



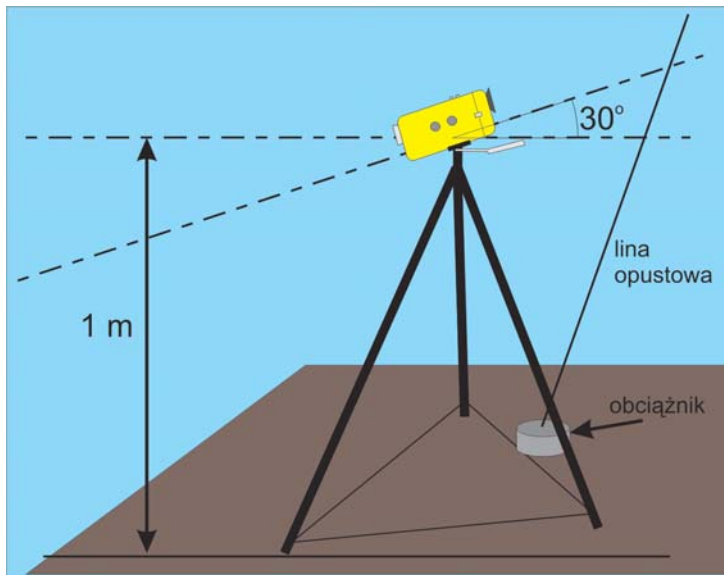
Fot. 2. Kotwiczka – przyrząd do pośredniego poboru prób jakościowych makroglonów i okrytozależkowych (fot. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu)



Rys. 1. DAK – przyrząd do bezpośredniego poboru prób ilościowych makroglonów i okrytozałążkowych przez pletwonurka (Andrulewicz i in., 2004)

2.2.2. Sprzęt do wykonania dokumentacji fotograficznej

- zestaw do fotografii podwodnej (aparat cyfrowy w obudowie wodoszczelnej),
- stojak fotograficzny z możliwością regulacji wysokości i kąta nachylenia (rys. 2),
- kompas nurkowy.



Rys. 2. Schemat ustawienia zestawu do wykonywania dokumentacji fotograficznej w punkcie pomiarowo-kontrolnym w środowiskowych badaniach bezpośrednich makroglonów i okrytozałążkowych

2.2.3. Sprzęt do zabezpieczenia prób

Zarówno przy poborze *pośrednim* jak i *bezpośrednim*:

- plastikowe worki o pojemności 35 dm^3 – 5 sztuk na punkt pomiarowo-kontrolny,
- woreczki z zapięciem strunowym (np. $6,0 \times 9,5 \text{ cm}$) – 5 sztuk na punkt pomiarowo-kontrolny,
- kartki z kalki technicznej z danymi każdej próby (rozdz. 2.3) – 5 sztuk na punkt pomiarowo-kontrolny,
- kuweta (min. $1 \times 1 \text{ m}$) – do badań *pośrednich*,
- kuweta np. $37 \times 48 \text{ cm}$ – do badań *bezpośrednich*,
- plastikowa tryskawka do opłukiwania worków siatkowych podczas przenoszenia prób na pokładzie jednostki do worków plastikowych, spłukiwania siatki wyścielającej chwytacz oraz do spłukiwania roślin z sita,
- sito o średnicy ok. 30 cm i wielkości oczek nie większej niż $0,5 \text{ mm}$,
- nożyczki lub nóż,
- pęseta,
- ołówki (min. 3 sztuki), temperówka,
- pojemnik termiczny z zamrożonymi wkładami,
- karty poboru prób – zał. 1 (pobór *pośredni*) lub zał. 3 (pobór *bezpośredni*).

2.2.4. Przyrządy i sprzęt do pomiarów i przechowywania prób do analiz parametrów fizykochemicznych

Pomiary wykonywane z pokładu jednostki pływającej należy wykonać przy pomocy:

- krążka Secchiego do pomiaru przezroczystości wody,
- termometru na linie z zaznaczonymi odcinkami $0,5 \text{ m}$ do pomiaru temperatury nad dnem (w przypadku badań *bezpośrednich* odczytu temperatury dokonuje pletwonurek z komputera nurkowego),
- salinometru (z elektrodą na odpowiednio długim kablu) umożliwiającym pomiar zasolenia przy dnie,
- przyrządu do terenowego pomiaru w osadach pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego Eh (redox),
- przyrządu do poboru prób wód naddennych do oznaczenia w laboratorium: azotu całkowitego ($N_{\text{całk.}}$), azotu nieorganicznego ($N_{\text{norg.}}$), fosforu całkowitego ($P_{\text{całk.}}$) i fosforu nieorganicznego ($P_{\text{norg.}}$).

Należy używać przyrządów pomiarowych, co najmniej o klasie wodoszczelności: bryzgoszczelne, przystosowanych do pracy w środowisku morskim.

Przyrządy i sprzęt do badań parametrów fizykochemicznych należy skompletować zgodnie z normami i przewodnikami metodycznymi do poboru prób przeznaczonych do analiz chemicznych ww. związków.

2.3. Przygotowanie przyrządów i sprzętu do poboru prób

W zależności od zaplanowanej metody badań (*pośredniej* lub *bezpośredniej*) (rozdz. 2.5.2 i 2.5.3) osoba biorąca udział w rejsie powinna:

- sprawdzić sprzęt pod kątem jego właściwego funkcjonowania, a w razie konieczności wykonać niezbędne naprawy lub uzupełnienia brakujących elementów,
- przy kompletowaniu sprzętu na rejsy uwzględnić około 50% zapas elementów, które mogą ulec zniszczeniu lub zagubieniu (np. worki, kartki, worki siatkowe),
- przygotować karty poboru prób (co najmniej dwa komplety),
- przygotować i opisać karteczki z kalki technicznej dla każdej przewidzianej próby (jakościowej i ilościowej) z następującą informacją zapisaną ołówkiem:
 - data poboru,
 - symbol punktu pomiarowo-kontrolnego oraz:
 - dla poboru *pośredniego*: symbol próby: A, B, C lub D, (np.: 8/A) oraz literkę „J” w przypadku próby jakościowej (np.: 8/J),
 - dla poboru *bezpośredniego*: symbol próby: N, W, E lub S, (np. T12/N) oraz literkę „J” w przypadku próby jakościowej (np.: T12/J).
 - karteczki z opisem próby umieścić w plastikowych woreczkach z zapięciem strunowym.
- przygotować dla pletwonurka worek transportowy z 5 workami siatkowymi z umieszczonymi w nich kartkami opisu prób.

Powyższe wyszczególnienie nie obejmuje przygotowania sprzętu nurkowego.

Sprzęt do badań parametrów fizykochemicznych przygotowuje laboratorium chemiczne wg określonych procedur.

2.4. Postępowanie na jednostce pływającej

W celu zlokalizowania wyznaczonego punktu pomiarowo-kontrolnego należy posługiwać się systemem GPS będącym na wyposażeniu jednostki pływającej lub korzystając z ręcznych urządzeń GPS przystosowanych do warunków morskich.

W trakcie płynięcia na punkt pomiarowo-kontrolny należy zabezpieczyć zgromadzony na pokładzie jednostki pływającej sprzęt przed przypadkowym wypadnięciem za burtę.

Po dopłynięciu na punkt pomiarowo-kontrolny, w zależności od rodzaju badań postępujemy w odmienny sposób:

- dla badań *pośrednich*: kotwiczymy, w taki sposób, żeby po uwzględnieniu kierunku wiatru oraz długości liny kotwicznej jednostka pływająca zdryfowała na punkt pomiarowo-kontrolny (w pozycji wskazanej przez GPS),
- dla badań *bezpośrednich*: w pierwszej kolejności w miejscu punktu pomiarowo-kontrolnego (w pozycji wskazanej przez GPS) zrzucamy obciążnik z bojką, następnie odpływamy i kotwiczymy jednostkę pływającą w najmniejszej możliwej odległości od zrzuconego obciążnika, jednak tak, aby lina kotwiczna nie przeszkadzała w pracy pletwonurka pod wodą.

Po zakotwiczeniu jednostki pływającej, a przed rozpoczęciem wykonywania pomiarów i poboru prób, należy uporządkować i rozłożyć sprzęt do pomiarów, poboru i zabezpieczenia prób w taki sposób, aby można swobodnie wykonać zaplanowane czynności.

Po przygotowaniu sprzętu na jednostce pływającej, zarówno w przypadku badań pośrednich, jak i bezpośrednich kolejność czynności powinna być następująca:

- wykonanie pomiarów fizykochemicznych,
- pobranie prób ilościowych, a następnie próby jakościowej.

W przypadku badań *bezpośrednich*, przed pobraniem prób makrofityków pętlonurek powinien wypełnić tabliczkę (zał. 2) oraz wykonać dokumentację fotograficzną.

O rozpoczęciu pomiarów oraz poborze prób w punkcie pomiarowo-kontrolnym, ich zakończeniu lub przerwaniu w dowolnym momencie, ze względu, na przykład na zmianę warunków atmosferycznych lub inne zdarzenia nautyczne, decyduje uprawniona osoba odpowiedzialna za prowadzenie jednostki pływającej. Za merytoryczną stronę wykonania badań, odpowiedzialna jest uprawniona osoba ze strony instytucji realizującej monitoring. Wszelkie odstępstwa od zaplanowanych działań powinny być odnotowane w karcie poboru prób. Decyzję o możliwości wykonania badań bezpośrednich podejmuje uprawniona osoba, prowadząca podwodne prace badawcze.

2.5. Pomiary i pobór prób

2.5.1. Pomiary parametrów fizykochemicznych

Osoba odpowiedzialna za zabezpieczenie prób na pokładzie jednostki pływającej powinna zmierzyć:

- przezroczystość wody krążkiem Secchiego (od strony zacienionej burty),
- zasolenie wody przy dnie, salinometrem,
- temperaturę wody przy dnie,
- pH i potencjał redox w osadach (pomiarów wykonać zgodnie z normami i przewodnikami do badań parametrów fizykochemicznych).

Wyniki wykonanych pomiarów należy zanotować w karcie poboru prób (zał. 1 – badania pośrednie, zał. 3 – badania bezpośrednie).

Pobór prób osadów i wód naddennych do oznaczeń stężenia $N_{\text{całk.}}$, $N_{\text{norg.}}$, $P_{\text{całk.}}$, $P_{\text{norg.}}$ należy wykonać zgodnie z normami i przewodnikami do poboru prób przeznaczonych do analiz chemicznych ww. związków.

2.5.2. Badania pośrednie

Pobór prób ilościowych

- opuścić powoli z pokładu chwytacz Bernatowicza unikając gwałtownego uderzenia nim w dno,
- po upewnieniu się że przyrząd jest na dnie, po lekko napiętej linie opuścić posyłacz, który zwalniając sprężynę spowoduje zamknięcie chwytacza pod wodą,

- wyciągnąć zamknięty chwytacz na pokład,
- zabezpieczyć pobraną próbę na pokładzie (rozdz. 2.6.1),
- powtórzyć trzykrotnie pobór prób chwytaczem na punkcie pomiarowo-kontrolnym (w miarę możliwości z drugiej burty, od dziobu i z rufy jednostki). Łącznie, na ppk należy pobrać cztery próby ilościowe.

Pobór próby jakościowej

- opuścić kotwiczkę z pokładu na dno,
- wykonać zaciąg kotwiczką po dnie wzdłuż burty jednostki pływającej,
- wyciągnąć kotwiczkę z roślinami na pokład,
- zabezpieczyć pobraną próbę na pokładzie (rozdz. 2.6.1),
- w przypadku braku lub niewystarczającej ilości materiału, powtórzyć zaciąg z drugiej burty jednostki.

2.5.3. Badania bezpośrednie

Po zejściu na dno przy obciążniku wyznaczającym ppk, pławonurek:

- ustawia zestaw do fotografii podwodnej na dnie w miejscu obciążnika (rys. 2),
- zabezpiecza komplet worków przed wypłynięciem na powierzchnię wody,
- wypełnia tabelę umieszczoną na tabliczce (zał. 2).

Wykonanie podwodnej dokumentacji fotograficznej

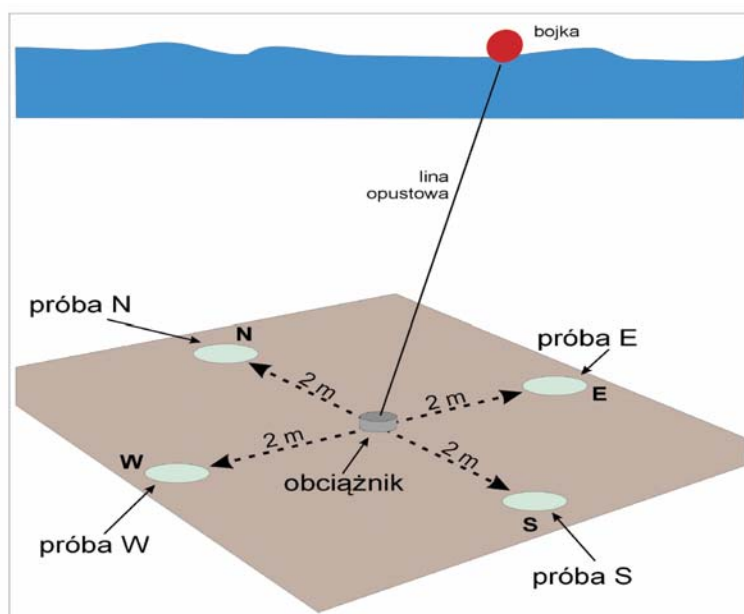
- określić przy pomocy kompasu kierunek północny i w tym kierunku skierować obiektyw zestawu do fotografii,
- wykonać od 4 do 6 zdjęć w tym kierunku, zmieniając położenie zestawu o kilka stopni po obu stronach od obranego kierunku,
- powtórzyć kolejno ww. czynności także w kierunku wschodnim, południowym i zachodnim; należy zachować kolejność wyznaczania poszczególnych kierunków na wszystkich punktach pomiarowo-kontrolnych (zgodnie z ruchem wskazówek zegara),
- wykonać tzw. zdjęcie rozdzielające (np. fotografując dłoń), pomiędzy poszczególnymi kierunkami, w których wykonywane są zdjęcia.

Pobór prób ilościowych

- założyć worek siatkowy (z karteczką opisaną np.: T12/N) na przyrząd DAK,
- wyznaczyć za pomocą taśmy mierniczej miejsce poboru pierwszej próby w odległości 2 m na północ od obciążnika (rys. 3),
- przyłożyć przyrząd DAK do dna w wyznaczonym miejscu,
- zerwać wszystkie rośliny z miejsca, które obejmuje ramka i przełożyć do worka siatkowego (fot. 3),
- makroglony na dnie twardym (głazy, kamienie) należy pobierać zeskrobując je szpachelką,
- makroglony porastające drobne kamienie należy zbierać z powierzchni dna wyznaczonej przez ramkę wraz kamieniami,

- okrytozałążkowe na miękkim podłożu (żwir, piasek, piasek mulisty, muł) należy zrywać dłonią, delikatnie podważając je z dna,
- po pobraniu próby należy zdjąć worek siatkowy z przyrządu DAK w sposób uniemożliwiający wydostanie się zawartości, zawiązać, a następnie umieścić w worku transportowym.

Opisane czynności wykonać w trzech miejscach wytyczonych przez pozostałe kierunki świata, tj. wschodnim, południowym i zachodnim (E, S, W) od obciążnika.



Rys. 3. Schemat rozmieszczenia miejsc poboru prób ilościowych (N, E, S i W) na punkcie pomiarowo-kontrolnym

Pobór próby jakościowej

- wyciągnąć oznakowany worek siatkowy do poboru próby jakościowej (z karteczką opisaną np.: T12/J) z worka transportowego,
- zerwać całe okazy roślin (po kilka sztuk z każdego różniącego się makroskopowo taksonu) w polu o promieniu do 5 m od obciążnika,
- po zakończeniu poboru zawiązać worek siatkowy i umieścić go w worku transportowym.

Po zakończeniu poboru prób w punkcie pomiarowo-kontrolnym pływacz zbiera sprzęt i wraz z próbami przekazuje go na pokład jednostki pływającej osobie odpowiedzialnej za zabezpieczenie prób.



Fot. 3. Płetwonurek podczas poboru próby ilościowej za pomocą przyrządu DAK (fot. M. Kuliński)

2.6. Procedura postępowania z pobranymi próbkami na pokładzie

2.6.1. Zabezpieczenie prób przed zmianą składu i właściwości

Próby pobrane metodą pośrednią

Próba ilościowa:

- po pobraniu próby ilościowej, rośliny wiszące z boków chwytacza obciąć nożyczkami lub nożem i odrzucić jako fragmenty pochodzące spoza powierzchni zajmowanej przez chwytacz,
- zawartość chwytacza przenieść na kuwetę (min. 1 x 1 m),
- w przypadku roślin pozostałych na siatce wyścielającej chwytacz, spłukać je do pojemnika za pomocą tryskawki,
- zawartość pojemnika przelać na sito, a pozostały na nim materiał roślinny przenieść ilościowo, tzn. bez strat, pesetą do worka plastikowego, do którego włożyć kartkę z opisem próby zamkniętą w woreczku plastikowym z zapięciem strunowym,
- worek plastikowy zawiązać i umieścić w pojemniku termicznym z zamrożonymi wkładami.

Próba jakościowa:

- kotwiczkę wraz z próbą jakościową umieścić na kuwecie i opłukać wodą eliminując z próby osad, następnie wszystkie rośliny znajdujące się na kotwiczce przenieść do worka plastikowego,

- do worka plastikowego z próbą włożyć kartkę z opisem próby,
- worek plastikowy zawiązać i umieścić w pojemniku termicznym z zamrożonymi wkładami.

Próby pobrane metodą bezpośrednią

Próba ilościowa:

- próbę ilościową z worka siatkowego przenieść dłonią (nad kuwetą) do worka plastikowego i sprawdzić czy kartka z opisem próby jest czytelna,
- pozostałe na ściankach worka siatkowego rośliny wybrać pęsetą lub ręcznie i opłukać wodą przy pomocy tryskawki. Rośliny splukane w ten sposób do kuwety wraz z wodą przelać na sito, materiał z sita przenieść ilościowo pęsetą do plastikowego worka,
- worek plastikowy z próbą zawiązać i umieścić w pojemniku termicznym z zamrożonymi wkładami.

Próba jakościowa:

- próbę jakościową z worka siatkowego przenieść dłonią (nad kuwetą) do worka plastikowego i sprawdzić czy oznakowanie próby jest czytelne,
- worek plastikowy zawiązać i umieścić w pojemniku termicznym z zamrożonymi wkładami.

2.6.2. Wypełnianie karty poboru prób

- W karcie poboru prób (zał. 1 lub 3) należy notować wszystkie istotne dla poboru prób informacje. Zaleca się stosowanie ołówka, gdyż w razie zamoczenia karty zapis ołówkiem nie rozmazuje się.
- Przy *bezpośrednim* poborze prób należy dodatkowo uzupełnić kartę (zał. 3) o informacje z tabeli płetwonurka (zał. 2) oraz jego obserwacje.

Zabezpieczenie prób osadów i wód naddennych do oznaczeń parametrów fizykochemicznych należy wykonać zgodnie z normami i przewodnikami metodycznymi do poboru prób przeznaczonych do analiz chemicznych.

2.7. Przekazanie prób do laboratorium

- Próby po przywiezieniu do laboratorium należy przekazać pracownikowi, który zabezpieczy próby.
- Przekazać również karty poboru prób, które należy wpiąć do segregatora oznaczonego symbolem typu wód.

Przekazanie prób osadów i wód naddanych do analizy laboratoryjnej parametrów fizykochemicznych należy wykonać zgodnie z normami i przewodnikami metodycznymi do poboru prób przeznaczonych do analiz chemicznych.

2.8. Konserwowanie i przechowywanie prób makrofitów

- wyjąć z worka z próbą kartkę z opisem próby i włożyć do kuwety,
- próbę przepłukać z osadów – w tym celu porcjami przekładać próbę na sito i przepłukiwać pod bieżącą letnią wodą nad wiadrzem/miską tak aby oczyścić całkowicie próbę z osadów,
- oczyszczony materiał roślinny przenosić z sita do kuwety,
- pozostałe na sicie rośliny, ich szczątki, korzenie itp. przenosić ilościowo, tzn. bez strat, do kuwety,
- jeśli próba zawiera kamienie dokładnie je oczyścić nad kuwetą z roślin za pomocą szpachelki lub noża,
- jeżeli przepłukana próba nie może być od razu analizowana, należy umieścić ją wraz z kartką z opisem próby w worku z zapięciem strunowym i przechowywać w zamrażarce, w temperaturze poniżej -18°C , nie dłużej niż pół roku,
- rozmrożonej do analiz laboratoryjnych próby nie należy ponownie zamrażać, jednak w razie nie zakończenia analizy można próbę przechować w lodówce, nie dłużej niż dwa dni,
- nieprzepłukane próby można przechowywać w lodówce, jednak nie dłużej niż trzy dni.

3. Analizy laboratoryjne prób makrofitów

Analizy laboratoryjne prób należy przeprowadzić w zakresie:

- składu gatunkowego, w przypadku prób jakościowych,
- biomasy wyrażonej suchą masą, w przypadku prób ilościowych.

3.1. Personel

- wykwalifikowany pracownik wykonujący analizy,
- kierownik laboratorium nadzorujący analizy.

3.2. Aparatura i sprzęt

Aparatura

- mikroskop biologiczny: okulary o powiększeniu 10x lub 12,5x; obiektywy o powiększeniu 5x, 10x, 20x, 40x,
- suszarka laboratoryjna z regulowanym zakresem temperatury,
- waga analityczna jednoszalkowa lub elektroniczna (max 100 g, dokładność odczytu 0,001 g),
- zamrażarka szufladowa mrożąca do temperatury -18°C ,

Sprzęt

- pęsety,
- igły preparacyjne,
- sito o średnicy ok. 30 cm i wielkości oczek nie większej niż 0,5 mm,
- wiadro/miska o średnicy ok. 40 cm,
- biała kuweta (37 x 48 cm),
- szpachelka/nóż,
- szalki Petriego/małe kuwety lub płaskie pojemniki plastikowe,
- arkusze bibuły filtracyjnej,
- kartki z kalki technicznej,
- etykiety identyfikacyjne okazów zielnikowych ze stałymi rubrykami (nazwa taksonu i autor nazwy, nazwa i kod jednolitej części wód, nr ppk/próby, data poboru próby, imię i nazwisko osoby oznaczającej),
- ołówki,
- folia aluminiowa,
- arkusze brystolu w formie bloków technicznych – format A4,
- sztywna płyta z tworzywa sztucznego lub sklejki – format A4,
- obciążniki (min. 4 szt. po ok. 1 kg każdy),
- folia ochronna (pakowa) lub koszulki przezroczyste – format A4.

3.3. Przygotowanie próby do analiz

W przypadku przechowywanej w zamrażarce próby:

- próbę w worku rozmrozić w temperaturze pokojowej lub letniej wodzie, co zajmuje od 0,5-1,5 h, w zależności od wielkości próby,
- rozmrożoną próbę wraz z jej kartką z opisem przełożyć do kuwety i przystąpić do analiz (patrz niżej),
- jeśli próba nie jest zamrożona, tzn. jest bezpośrednio po oczyszczeniu osadów i kamieni, można przystąpić do analiz (patrz niżej).

3.4. Analiza jakościowa

Wykonanie analizy jakościowej polega na oznaczeniu taksonów występujących w próbce na podstawie specjalistycznej literatury – kluczy do oznaczania gatunków (zał. 4), zgodnie z obowiązującą nomenklaturą (Dąbska i Karpiński, 1954, Rothmalar i in., 1976, Nielsen i in., 1995) (zał. 5). Oznaczenia wykonuje się makroskopowo i przy użyciu mikroskopu biologicznego w następujący sposób:

- próbę w kuwecie (37 x 48 cm) z wodą rozdzielać na taksony, przenosząc wydzielone gatunki lub rodzaje na szalki Petriego lub mniejsze kuwety (fot. 4),
- zweryfikować oznaczone taksony pod mikroskopem i przy pomocy kluczy do oznaczania gatunków,

- w przypadku wątpliwości zaleca się wykonywanie dokumentacji fotograficznej spod mikroskopu i makroskopowej oraz wykonanie materiałów zielnikowych, w celu weryfikacji oznaczeń taksonomicznych przez specjalistów,
- skład gatunkowy próby notować w karcie wyników analiz laboratoryjnych makrofitów (zał. 6).



Fot. 4. Makroskopowe segregowanie próby na poszczególne taksony makrofitów (fot. M. Błęńska)

3.5. Wykonanie i przechowywanie materiałów zielnikowych

Po wykonaniu analizy jakościowej należy utrwalić poszczególne oznaczone taksony tworząc okaz zielnikowy. Należy wybierać całe, kompletne, najmniej uszkodzone okazy.

Przygotowanie okazu zielnikowego:

- na zanurzony w kuwecie arkusz brystolu przenieść wybrany okaz roślinny, następnie delikatnie unosząc bok arkusza od strony wykonującego zielnik, zlać z niego wodę układając jednocześnie pęsetą roślinę,
- ułożony na brystolu okaz wraz z etykietą identyfikacyjną umieścić na arkuszu bibuły złożonym na pół, przykrywając go dwoma lub trzema podobnie złożonymi arkuszami bibuły,
- na tak przygotowany okaz zielnikowy należy położyć płytę drewnianą lub z tworzywa sztucznego i dociażyć z góry w każdym rogu obciążnikiem, pozostawiając w temperaturze pokojowej i dobrze wentylowanym pomieszczeniu, co drugi dzień wymieniając bibułę,

- po wysuszeniu, jeżeli okaz się nie przykleił (tak może być w przypadku roślin okrytozalążkowych), okaz przykleić przezroczystą taśmą w dwóch, trzech miejscach,
- zabezpieczyć arkusz brystolu z okazem i etykietą identyfikacyjną folią ochronną lub włożyć do przezroczystej koszulki i umieścić w segregatorze,
- arkusze zielnikowe przechowywać w suchym, przewiewnym miejscu w temperaturze pokojowej, często sprawdzać ich stan.
- w karcie wyników analiz laboratoryjnych (zał. 6) ze składem taksonomicznym próby jakościowej zanotować „oz” w kolumnie „uwagi”, przy danym taksonie, z którego utworzono okaz zielnikowy.

3.6. Analiza ilościowa

Wykonanie analizy ilościowej polega na określeniu suchej masy taksonów wydzielonych z próby. W tym celu należy:

- próbę w białej kuwecie (37 x 48 cm) z wodą rozdzielać na taksony, przenosząc ilościowo na poszczególne szalki Petriego lub mniejsze kuwety (fot. 3),
- zweryfikować oznaczone taksony pod mikroskopem,
- w przypadku wątpliwości zaleca się wykonywanie dokumentacji fotograficznej spod mikroskopu i makroskopowej, w celu weryfikacji oznaczeń taksonomicznych przez specjalistów,
- wydzielone i zidentyfikowane taksony odsączyć z wody na bibule filtracyjnej (nie krócej niż 1 minuta),
- przenieść na kawałki folii aluminiowej i opisać (na kartce z kalki technicznej napisać ołówkiem oznaczenie ppk/próby, nazwę taksonu/taksonów, datę poboru próby) (fot. 5),
- folię aluminiową z taksonami umieścić w suszarce, w temperaturze 60°C, na minimum 11 dni; suszenie powinno gwarantować stałą masę;
- wysuszone taksony ważyć na wadze analitycznej jednoszalkowej z dokładnością do 0,001 g,
- ważyć taksony bezpośrednio po wyjęciu z suszarki, ponieważ absorbują wilgoć z powietrza, co może wpływać na wyniki,
- wynik biomasy taksonu wyrażać w jednostce g s.m./próba,
- wyniki biomasy zapisywać w karcie wyników analiz laboratoryjnych (zał. 6). Wyniki należy archiwizować również w komputerowej bazie danych.

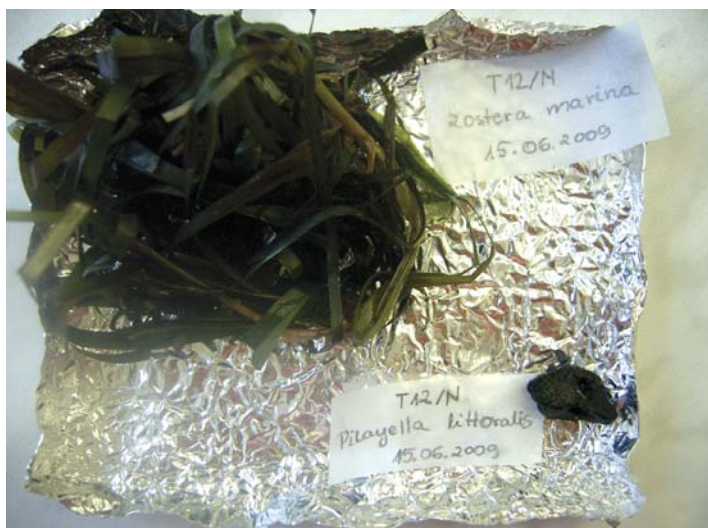
Wypełnianie karty wyników analiz próby ilościowej

Podczas wypełniania karty wyników analiz laboratoryjnych próby makrofitów (zał. 6) należy mieć na uwadze, że w przypadku:

- glonów takich jak: *Pilayella littoralis*, *Ectocarpus siliculosus*, *Ceramium* spp., *Enteromorpha* spp. nie zawsze jest możliwe makroskopowe rozdzielenie

poszczególnych gatunków w próbie. Wówczas należy ważyć rodzaj i dla niego podać suchą masę, a w tabeli dotyczącej składu gatunkowego na ppk podać wszystkie zidentyfikowane w próbie gatunki tego rodzaju. Podobnie postępujemy w przypadku rdestnic, *Potamogeton pectinatus*, *Potamogeton filiformis*, które po dłuższym okresie konserwacji podczas płukania próby mogą ulegać fragmentacji, utrudniającej identyfikację poszczególnych części roślin do gatunku. Dla obu tych gatunków określamy biomasę rodzaju,

- gatunków epifitycznych np. *Acrochaetium* sp., które obficie mogą porastać inne rośliny (*Zostera marina*, *Polysiphonia fucoides*, *Enteromorpha* spp.) nie zawsze jest możliwe oddzielenie ich od gatunku, który porastają. Wówczas należy wpisać oba gatunki oraz zanotować procent pokrycia rośliny przez gatunek epifityczny, np. *Zostera marina* + *Acrochaetium* sp. (40%),
- nie ważyć oderwanych korzeni.



Fot. 5. Wydzielone z próby i zidentyfikowane taksony makrofitów przygotowane do umieszczenia w suszarce (fot. P. Brzeska)

Należy zapisywać wszelkie spostrzeżenia dotyczące analizowanej próby, np. porastanie gatunków przez okrzemki, pąkle lub młodociane omułki; obecność detrytusy, małych ryb.

Kontrola jakości analiz laboratoryjnych

W celu spełnienia wymogów zapewnienia jakości procedur laboratoryjnych:

- 30% prób powinno być ponownie oznaczonych przez innego specjalistę,
- taksony z 30% prób ilościowych powinno, bezpośrednio po określeniu biomasy, być zważone ponownie przez innego specjalistę.

Literatura

- Andrulewicz E., L. Kruk-Dowgiałło, A. Osowiecki 2004. Phytobenthos and macrozoobenthos of the Slupsk Bank stony reefs, Baltic Sea. *Hydrobiologia* 514: 163–170.
- Bäck S. 1999. Guidelines for monitoring of phytobenthic plant and animal communities In the Baltic Sea. Annex for HELCOM COMBINE programme. Annex C-9. Finnish Environmental Institute. 12 s.
- Bernatowicz S., Wolny P. 1969. Botanika rybacka. Podręcznik dla studentów katedr limnologii i rybactwa. PWR IL, Warszawa: 48–52.
- Dąbmska I., Karpiński J. 1954. Ramienice. Klucz do oznaczania gatunków krajowych. PWN Warszawa, 127 s.
- EU WFD 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Official Journal of the European Communities L 327, s. 71
- Hällsors G., I. Viitasalo, Å. Niemi 1987. Macrophyte vegetation and trophic status of the Gulf of Finland a review of Finnish investigations. *Meri* 13: 111–158.
- Kenneth A. Kershaw 1973. Quantitative and dynamic plant ecology. (red.). E. Arnold, London, s. 381.
- Kautsky H. 1993. Methods for monitoring of phytobenthic plant and animal communities in the Baltic Sea. The ecology of Baltic terrestrial, coastal and offshore areas - protection and management. Editor M. Pliński. Proceedings of the Conference, Sopot, Poland 11-th-12-th December 1992, Part 1 – Marine environment, Gdańsk: 21–61.
- Kautsky H. 1995, Quantitive distribution of sublitoral plant and animal communities along the Baltic Sea gradient in biology and ecology of Shallow Coastal Waters. Proc. 28th Eur. Mar. Biol. Symp. Olsen & Olsen. Fredensborg, Denmark: 23–30.
- Klusek Z., N. Gorska J. Tęgowski, K. Groza, D. Faghani, L. Gajewski, J. Nowak, L. Kruk-Dowgiałło, R. Opióła 2003. Acustical techniques of underwater meadow monitoring in the Puck Bay (Southern Baltic Sea). *Hydroacustics, Annual Journal* vol. 6: 79–90.
- Kruk-Dowgiałło (red.) 2000a. Przyrodnicza waloryzacja morskich obszarów chronionych HELCOM BSPA województwa pomorskiego. T. 1. Słowiński Park Narodowy. CRANGON 5 CBM PAN, Gdynia. 116 s.
- Kruk-Dowgiałło (red.) 2000b. Przyrodnicza waloryzacja morskich obszarów chronionych HELCOM BSPA województwa pomorskiego. T. 3. Nadmorski Park Krajobrazowy. CRANGON 7. CBM PAN, Gdynia. 186 s.
- Kruk-Dowgiałło L., R. Opióła 2001. Makrofitobentos. Charakterystyka biologiczna. (w:) Warunki środowiskowe polskiej strefy południowego Bałtyku w 2000 roku. IMGW, Materiały Oddziału Morskiego, Gdynia: 160–167.

- Kruk-Dowgiałło L., R. Opiola, A. Osowiecki, P. Brzeska, M. Błęńska 2007. Badania środowiskowe określające wpływ progów podwodnych w rejonie Gdyni Orłowa na zespoły fauny i flory dennej, WW IM w Gdańsku nr 6352, s. 49.
- Krzywiński W., Kruk-Dowgiałło L., Zawadzka-Kahlau E., Dubrawski R., Kamińska M., Łysiak-Pastuszak E. 2004. Typology of Polish marine waters. Pod redakcją G. Schernewski i M. Wielgat. *Baltic Sea Typology. Costaline Raports* 4: 39–48.
- Krzywiński W., Kruk-Dowgiałło L. 2005. Typologia polskich wód morskich – krok do przodu w kierunku doskonalenia ochrony wód. (w:) II Kongres Inżynierii Środowiska T. 2 Monografie nr 33. PAN, KIŚ, Lublin: 271–281.
- Nielsen R., Kristiansen A., Mathiesen L., Mathiesen H. 1995. Distrbtutional index of the benthic macroalgae of the Baltic Sea area. *Acta Botanica Fennica*. No.155. The BMB Publication No. 18, Vammala, s. 51.
- Osowiecki A., L. Kruk-Dowgiałło (red.) 2006 Różnorodność biologiczna przybrzeżnego głazowiska Rowy przy Słowińskim Parku Narodowym. Wyd. Nauk. IM w Gdańsku. S. 127.
- Osowiecki A., L. Kruk-Dowgiałło. 2007. Applying combined biological methods with remote sensing techniques in studies of marine biodiversity, bottom habitats and communities of flora and fauna. *Environment Protection Engineering*. No 2, Wrocław: 193–205.
- Osowiecki A., Kruk-Dowgiałło L., Błęńska M., Brzeska P., Michałek-Pogorzelska M., Dubiński M., Krzywiński W., Łysiak-Pastuszak E., Góralski J., Chojnacki W., Marcinkow A., Kazała P. 2009. Opracowanie metodyki badania i klasyfikacji elementów biologicznych w procedurze oceny stanu ekologicznego jednolitych części morskich wód przejściowych i przybrzeżnych wraz z udziałem w europejskim ćwiczeniu interkalibracyjnym. Sprawozdanie z etapu II. Narodowa Fundacja Ochrony Środowiska w Warszawie i Instytut Morski w Gdańsku. Warszawa. 102 s.
- Pliński M., 2005. The hydrobiological characteristics of the Polish part of the Vistula Lagoon: A review. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 36(3): 287–294.
- Pliński M., 1995. Vascular plants of the northern part of the Vistula Lagoon. *Bull Mar Inst* 22:81–87.
- Pliński M., Kreńska B., Wnorowski T. 1978. Stosunki florystyczne i biomasa roślinności naczyniowej Zalewu Wiślanego. (w:) *Biologia Morza* (4). Zalew Wiślany. Zmiany w biocenozach pod wpływem presji antropogennych. SiMO Nr 21: 161–196
- Rothmaler W., Schubert R., Vent W., Bäßler M. 1976. *Excursionflora für die Gebiete der DDR und der BRD*. Kritisher Band. Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin, 811 s.
- Żmudziński L. (red.) 2002. *Słownik Hydrobiologiczny*, PWN Warszawa, 287 s.

Załączniki

Załącznik 1. Wzór karty poboru prób wypełnianej na pokładzie jednostki pływającej podczas badań pośrednich makrofity

Załącznik 2. Tabela wypełniana przez pływaka w punkcie pomiarowo-kontrolnym (badania bezpośrednie)

Załącznik 3. Wzór karty poboru prób wypełnianej na pokładzie jednostki pływającej podczas badań bezpośrednich makrofity

Załącznik 4. Rekomendowana, dostępna w Polsce literatura do oznaczania taksonomicznego makrofity

Załącznik 5. Lista gatunków makroglonów i roślin okrytozalążkowych najczęściej notowanych w polskich wodach przybrzeżnych i przejściowych

Załącznik 6. Wzór karty wyników analiz laboratoryjnych prób makrofity

Załącznik 1

Wzór karty poboru prób wypełnianej na pokładzie jednostki pływającej
podczas badań pośrednich makrofitów

ppk	Współrz. geograficzne		Symbol próby	Termin [data/godz.*]	Głębokość [m]	Temp. dno [°C]	Zasolenie dno [PSU]	Przezroczystość [m]	pH/redox [mV]	Uwagi
	Długość	Szerokość								
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							
			A							
			B							
			C							
			D							
			Jakość							

* godzina wyjścia przyrządu poboru prób z wody

Informacje dodatkowe:

Jednostka realizująca:
Jednolita część wód (nazwa, kod):
Narzędzie poboru:

Powierzchnia poboru:
Osoba pobierająca próby [imię i nazwisko]:
Osoba zabezpieczająca próby [imię i nazwisko]:

Załącznik 2

Tabela wypełniana przez pletwonurka w punkcie pomiarowo-kontrolnym
(badania *bezpośrednie*)

ppk	Głębokość [m]	Temp. dno [°C]	Osad ¹	Pokrycie dna roślinami [%] ²		Uwagi
				przytwierdzonymi ³	nieprzytwierdzonymi ⁴	

¹ Osad: kamienisty (K) żwirowy (Z), piaszczysty (P), mulisty (M), kombinacje osadów, np. piaszczysto-mulisty (PM), itp. Dodatkowo zawrzeć informacje o występowaniu lub braku otoczków i głązów.

² W zaokrągleniu do 5%. Pokrycie szacowane wokół ppk – w promieniu 2 m od obciążnika.

³ Rośliny zakorzenione w dnie lub przytwierdzone do podłoża twardego niemobilnego.

⁴ *Pilayella littoralis*, *Ectocarpus siliculosus*, *Chaetomorpha linum*.

Załącznik 3

Wzór karty poboru prób wypełnianej na pokładzie jednostki pływającej podczas badań bezpośrednich makrofity

ppk	Współrz. geograficzne		Symbol próby	+/-	Termin [data/godz. ¹⁾	Głębokość [m]	Osad ²⁾	Pokrycie dna roślinami [%]		Temp. dna [°C]	Zasolenie dna [PSU]	Przezroczystość [m]	pH/redox [mV]	Uwagi
	Długość	Szerokość						przewierdzonymi	nieprzewierdzonymi					
			N											
			E											
			S											
			W											
			Jakość											
			N											
			E											
			S											
			W											
			Jakość											
			N											
			E											
			S											
			W											
			Jakość											
			N											
			E											
			S											
			W											
			Jakość											
			N											
			E											
			S											
			W											
			Jakość											

¹⁾ Godzina przekazania prób na pokład
²⁾ Osad: kamienisty (K) żwirowy (Z), piaszczysty (P), mulisty (M), kombinacje osadów, np. piaszczysto-mulisty (PM), itp.

Informacje zebrane przez osobę na jednostce pływającej
Informacje zebrane przez pletwonurka

Informacje dodatkowe:

Jednostka realizująca: Powierzchnia poboru:
Jednostka części wód (nazwa, kod): Osoba pobierająca próby [imię i nazwisko]:
Narzędzie poboru: Osoba zabezpieczająca próby [imię i nazwisko]:

Załącznik 4

Rekomendowana, dostępna w Polsce literatura do oznaczania taksonomicznego makrofitów

- Dąbska I, Karpiński J. 1954. Ramienice. Klucz do oznaczania gatunków krajowych. PWN Warszawa, 127 s.
- Kornmann P., P-H. Sahling 1977. Meeresalgen von Helgoland. Bentische Grün-, Braun- und Rotalgen. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 292 s.
- Mowszowicz J. 1973. Rośliny wodne krajowe. PWN Łódź, 451 s.
- Nielsen R., R. Kristiansen, L. Mathiesen, H. Mathiesen (red.) 1995. Distributional index of the benthic macroalgae of the Baltic Sea area. The Baltic Marine Biologists Publication, Vol. 155, No. 18: 1–51.
- Winogradowa K. L. 1976. Opredelitel wodoroslej dalnowostocznych moriej ZSSR. Wyd. „Nauka” Leningrad, s.147.
- Rothmaler W., Schubert R., Vent W., Bäßler M. 1976. Excursionflora für die Gebiete der DDR und der BRD. Kritischer Band. Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin, 811 s.
- Starmach K. 1977. Phaeophyta, Rhodophyta (w:) Flora słodkowodna Polski. T. 14. K. Starmach, J. Siemińska (red.), PAN Instytut Botaniki, Warszawa, Kraków. 445 s.

Załącznik 5

Lista gatunków makroglonów i roślin okrytozależkowych najczęściej notowanych w polskich wodach przybrzeżnych i przejściowych

Lp.	Nazwa taksonu	Autor nazwy	Rowy ¹⁾ PLCW II WB6E	Klif Ołowski ²⁾ PLTW III WB3	Zatoka Pucka wewnętrzna ³⁾ PLTW II WB2	Zatoka Pucka zewnętrzna ⁴⁾ PLTW III WB3
Chlorophyceae – zielenice		wg Nielsen i in. 1995				
1	<i>Chaetomorpha linum</i>	(O.F. Müll) Kütz.		+	+	+
2	<i>Cladophora glomerata</i>	(L.) Kütz.	+	+		+
3	<i>Cladophora rupestris</i>	(L.) Kütz.		+		
4	<i>Enteromorpha clathrata</i>	(Roth) Grev.		+		
5	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	(L.) Nees		+	+	+
6	<i>Enteromorpha linza</i>	(L.) J. Agardh.				+
7	<i>Enteromorpha prolifera</i>	(O.F. Müll) J. Agardh.		+	+	+
Charales – ramienice		wg Nielsen i in. 1995				
8	<i>Chara baltica</i>	Bruzelius			+	+
9	<i>Tolypella nidifica</i>	(O.F. Müll) A. Braun			+	+
Fucophyceae – brunatnice, dawniej: Phaeophyceae						
10	<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	(Huds.) Grev.				+
11	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	(Dillwyn) Lyngb.		+	+	+
12	<i>Pilayella littoralis</i> dawniej: <i>Pylaiella rupincola</i>	(L.) Kjellm.		+	+	+
13	<i>Pseudolithoderma extensum</i> dawniej: <i>Lithoderma extensum</i>	(P. Crouan & H. Crouan)		+		
14	<i>Sphacelaria cirrosa</i> dawniej: <i>Sphacelaria bipinnata</i>	(Roth) C. Agardh		+		
Bangiophyceae – krasnorosty, dawniej: Rhodophyceae		wg Nielsen i in. 1995				
15	<i>Acrochaetium</i> sp.			+		
16	<i>Ceramium diapahanum</i> dawniej: <i>Ceramium tenuissimum</i>	(Lightf.) Roth		+		+
17	<i>Ceramium nodulosum</i> dawniej: <i>Ceramium rubrum</i>	(Lightf.) Ducluz.	+			+
18	<i>Ceramium tenuicorne</i> dawniej: <i>Ceramium gracillimum</i>	(Kütz.) Waern	+	+	+	+
19	<i>Coccotylus truncatus</i> dawniej: <i>Phyllophora brodiaei</i>	(Pall.) M.J. Wynne & J.M. Heine	+	+		
20	<i>Furcellaria lumbricalis</i> dawniej: <i>Furcellaria fastigiata</i>	(Huds.) J.W. Lamour.	+	+		
21	<i>Hildenbrandia rubra</i> dawniej: <i>Hildenbrandia prototypus</i>	(Sommerf.) Menegh		+		
22	<i>Polysiphonia elongata</i>	(Huds.) Spreng.	+	+		
23	<i>Polysiphonia fucoides</i> dawniej: <i>Polysiphonia nigrescens</i> <i>Polysiphonia violacea</i>	(Huds.) Grev.		+		
24	<i>Rhodomela confervoides</i> dawniej: <i>Rhodomela subfusca</i>	(Huds.) P.C. Silva		+		

Lp.	Nazwa taksonu	Autor nazwy	Rowy ¹⁾ PLCW II WB6E	Klif Ołowski ²⁾ PLTW III WB3	Zatoka Pucka wewnętrzna ³⁾ PLTW II WB2	Zatoka Pucka zewnętrzna ⁴⁾ PLTW III WB3
	Angiospermae – okrytozależkowe	wg Rothmaler'a i in. 1976				
25	<i>Ceratophyllum demersum</i>	L.			+	
26	<i>Myriophyllum spicatum</i>	L.			+	+
27	<i>Potamogeton filiformis</i>	Pers.			+	+
28	<i>Potamogeton pectinatus</i>	L.		+	+	+
29	<i>Potamogeton perfoliatus</i>	L.			+	
30	<i>Ranunculus baudotii</i> , dawniej: <i>Batrachium baudotii</i>	Godr.			+	+
31	<i>Ruppia maritima</i>	L.			+	+
32	<i>Zannichellia palustris</i>	L.		+	+	+
33	<i>Zostera marina</i>	L.		+	+	+

¹⁾ Osowiecki i Kruk-Dowgiałło 2006

²⁾ Kruk-Dowgiałło i in. 2007

³⁾ Kruk-Dowgiałło i Opióła 2000

⁴⁾ Kruk-Dowgiałło 2000a i b

Załącznik 6

Wzór karty wyników analiz laboratoryjnych prób makrofitów

WYNIKI ANALIZ LABORATORYJNYCH PRÓB MAKROFITÓW

Nazwa i kod jednolitej części wód:
 Data poboru (dd-mm-rrrr):
 Ppk:
 Próba:
 Głębokość ppk [m]:
 Data włożenia próby do suszarki:
 Data wyjęcia próby z suszarki:

Lp.	Takson		Sucha masa [g/próba]	Uwagi
	Nazwa	Autor nazwy		
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

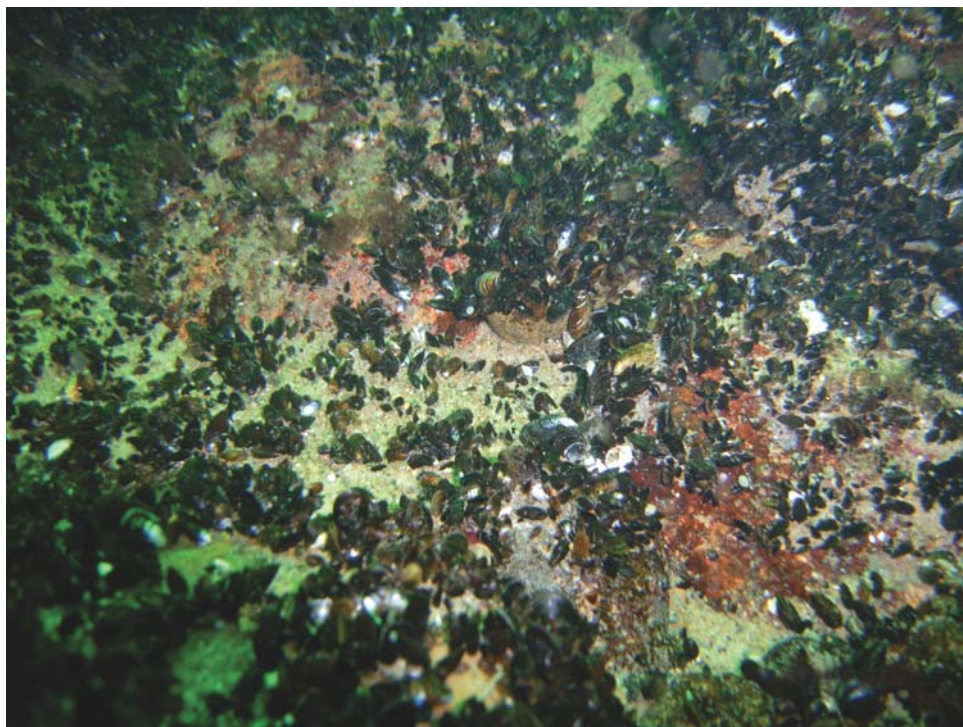
n.d. – nie dotyczy, oz – okaz zielnikowy

Uwagi:

Analizy wykonał(a): Data:
 [imię i nazwisko]

PRZEWODNIK METODYCZNY DO BADAŃ TERENOWYCH
I ANALIZ LABORATORYJNYCH FITOPLANKTONU,
INNEJ FLORY WODNEJ I MAKROBEZKRĘGOWCÓW
BENTOSOWYCH W WODACH PRZEJŚCIOWYCH
I PRZYBRZEŻNYCH

MAKROBEZKRĘGOWCE BENTOSOWE



Andrzej Osowiecki
Magdalena Błęńska

Spis treści

1. Wprowadzenie	67
2. Pobór prób	67
2.1. Przygotowanie sprzętu	67
2.2. Pobór prób	68
2.3. Przesiewanie prób na pokładzie	71
2.4. Oznaczanie pojemników i konserwacja prób	73
3. Analiza laboratoryjna	74
3.1. Barwienie	75
3.2. Przepłukiwanie próby	76
3.3. Podział na podpróby	77
3.4. Sortowanie materiału biologicznego	77
3.5. Identyfikacja taksonomiczna	78
3.6. Oznaczanie liczebności	79
3.7. Oznaczanie biomasy	79
3.8. Zapisywanie wyników	80
4. Lista taksonów notowanych w wodach przybrzeżnych i przejściowych	81
5. Rekomendowana literatura	82

1. Wprowadzenie

Makrobezkręgowce bentosowe (makrozoobentos) są frakcją organizmów zasiedlających powierzchnię osadów dennych (epifauna) lub ich wnętrza (infauna), która po przepłukaniu pozostaje na sicie o wymiarach oczka 1,0 mm.

Zespoły makrobezkręgowców bentosowych są odpowiednim przedmiotem badań monitoringowych ponieważ:

- w ich skład wchodzi gatunki wieloletnie (np. małże), które odzwierciedlają zmiany środowiskowe w retrospektywnie długim okresie ich życia;
- pobór prób jakościowych (skład taksonomiczny) i ilościowych (liczebność i biomasa) jest stosunkowo łatwy; zaletą makrozoobentosu jest także możliwość identyfikacji taksonomicznej po praktycznie nieograniczonym czasie konserwacji;
- są lepiej rozpoznane naukowo w stosunku do innych frakcji wielkościowych zamieszkujących dno (meiofauny i mikrofauny) oraz opracowano klucze taksonomiczne dla większości grup taksonomicznych.

Niniejszy przewodnik opiera się na wytycznych Komisji Helsińskiej (HELCOM 1988) dotyczących metodologii badań makrozoobentosu. Uzupełniono go o nowe elementy, np. możliwość konserwowania materiału biologicznego etanolem zamiast stosowanego dotychczas formaldehydu. Przewodnik zawiera wiele praktycznych uwag i propozycji rozwiązań, których autorami są eksperci mający wieloletnie doświadczenie w badaniach morskiego makrozoobentosu.

2. Pobór prób

Badania terenowe należy prowadzić wyłącznie w sprzyjających warunkach atmosferycznych – stan morza 0–2.

Optymalną porą roku do badania makrozoobentosu jest wiosna, okres w którym większość gatunków nie przystąpiła jeszcze do rozrodu. Najmniej korzystnym okresem jest lato, kiedy w strukturze ilościowej dominują młodociane osobniki, które niedawno przekształciły się z form larwalnych w dojrzałe osobniki. Wysokie liczebności młodocianych osobników, szczególnie małży, zniekształcają wyniki obliczeń wskaźników różnorodności biologicznej stosowanych do oceny stanu jakości ekologicznej wód.

2.1. Przygotowanie sprzętu

Do poboru prób należy przygotować sprzęt zgodnie z wykazem (tab. 1).

Tabela 1. Wykaz sprzętu i odczynników potrzebnych do przeprowadzenia badań terenowych

Czynność	Przyrząd/odczynnik	Uwagi
Pobór prób	czerpak van Veen czerpak Günther	Sprawdzić, czy czerpak ma odpowiednio zamocowane obciążenie. Sprawdzić stan osprzętu czerpaka (liny, łańcuchy, szkielety).
Przesiewanie prób na pokładzie*	pluczką z kratą wiadro z sitem 1 mm pęseta tryskawka plastikowa łyżka	Sprawdzić, czy siatka w sitach (1 mm) nie jest uszkodzona. Przesiewanie materiału biologicznego przez uszkodzoną siatkę jest niedopuszczalne.
Oznaczanie pojemników i konserwacja prób	pojemniki/worki na próby 40% roztwór formaldehydu lub 96% etanol strzykawka 40 ml karteczki z kalki technicznej wodoodporny marker lejek z szerokim wlotem	Pojemniki plastikowe 500–1000 ml z szerokim wlotem (pobór czerpakiem van Veen) Plastikowe worki – 30 l. (pobór czerpakiem Günther)

* nie dotyczy czerpaka Günther, z którego próby przenoszone są bezpośrednio do plastikowych worków oraz przesiewane i konserwowane w laboratorium.



Wskazane jest zabranie w rejs odpowiedniego zapasu (około 30%) worków/pojemników na próby i substancji konserwujących. Zaleca się zabieranie duplikatów sprzętu do poboru prób w morzu. Utrata lub uszkodzenie sprzętu nie może przeszkodzić w realizacji poboru prób.

2.2. Pobór prób

Poboru prób należy dokonywać z zakotwiczonej jednostki pływającej. Pozycję geograficzną poboru prób określa się za pomocą GPS po zaprzestaniu dryfowania na luźnym łańcuchu kotwicznym.

Pobór prób należy dokumentować w karcie poboru prób (załącznik 1).

Czerpak van Veen

Do poboru zaleca się stosowanie standardowego (dużej wersji) czerpaka typu van Veen o powierzchni chwytnej około 0,1 m² (fot. 1). Do poboru prób z dna miękkiego stosuje się czerpak o wadze 25–35 kg. W przypadku dna twardego (piaszczystego, ilastego) zwiększa się wagę czerpaka do 80 kg (fot. 2). W celu zmniejszenia fali uderzeniowej spowodowanej opuszczaniem czerpaka, otwory w górnej jego części powinny stanowić przynajmniej 60% powierzchni. Otwory powinny być zasłonięte metalową siatką o wymiarze oczka 0,5 mm.

Jednostka pływająca wykorzystywana do poboru prób makrozoobentosu czerpakiem van Veen powinna być wyposażona w:

- żuraw (wysokość od pokładu do bloku bomu powinna wynosić min. 3,5 m);
- dostęp do bieżącej wody zaburtowej z elastycznego węża;
- około 3 m² wolnego pokładu do wykonywania prac.



Fot. 1. Czerpak van Veen



Fot. 2. Dodatkowe dociążenie czerpaka van Veen

Na każdym punkcie pomiarowo-kontrolnym (ppk) należy dokonać pięciu zaczerpnięć. Zawartość każdego czerpaka traktuje się osobno w procesie konserwacji i późniejszej analizy laboratoryjnej.

Czerpak van Veen'a opuszczać należy na dno w odległości 0,5–1 m od burty statku. Gdy czerpak osiadzie na dnie (o czym świadczy luźna lina nośna) należy niezwłocznie przystąpić do jego podnoszenia. Zapobiegnie to przewróceniu się czerpaka spowodowanym dryfem bocznym (myszkowaniem) jednostki na kotwicy. Opuszczanie czerpaka na dno i jego podnoszenie powinno być wykonywane z minimalną prędkością windy (mniejszą niż 0,5 m · s⁻¹).



Powolne opuszczanie czerpaka zredukuje falę uderzeniową (woda pchana przez opadający czerpak) oraz ryzyko utraty części osadu w wyniku podniesienia czerpaka przed jego całkowitym zamknięciem.

Należy zapewnić pionowe położenie czepaka w momencie opuszczania i podnoszenia (kąt w stosunku do pionu linki stalowej, na której umocowany jest czepak, powinien być jak najmniejszy). Wszystkie czynności związane z podnoszeniem i opuszczaniem czepaka van Veen powinny być wykonywane przy użyciu windy.

W chwili zetknięcia się czepaka z dnem może się zdarzyć, że jego szczęki zatrzaskną się na kamieniu i podczas podnoszenia nastąpi wyciekanie z niego wody wraz z organizmami (fot. 3). W przypadku niedomknięcia się czepaka próby nie można uznać za ilościową. Czynność należy powtórzyć aż do momentu, gdy nastąpi całkowite zamknięcie szczęk.



Fot. 3. Niedomknięty czepak (konieczność ponownego poboru próby)

Czepak po wyciągnięciu nad wysokość pokładu należy chwycić, przenieść nad płuczkę z kratą i ostrożnie opuścić na kratę płuczki (fot. 4). Następnie otworzyć szczęki czepaka i wewnątrz przepłukać wodą zaburtową w celu oczyszczenia z resztek osadu (fot. 5).



Fot. 4. Opuszczanie czepaka na płuczkę



Fot. 5. Przepłukiwanie czepaka

Należy wizualnie oszacować objętość pobranego osadu. Jeśli czerpak pobrał mniej niż 5 litrów osadów, co zdarza się w przypadku dna piaszczystego lub osadów erozyjnych, należy pobrać nową próbę dodatkowo obciążając czerpak. Jeśli nadal pobrane zostanie mniej niż 5 l osadów, można użyć próbę do analizy zaznaczając objętość osadu w karcie poboru prób makrozoobentosu.

Zamknięty czerpak należy podnieść i do czasu zakończenia przepłukiwania pobranej próby odstawić na pokład. Po zdjęciu czerpaka z kraty, należy ją wyjąć z płuczki i przystąpić do przepłukiwania próby.

Czerpak Günther

Do poboru prób zaleca się używanie dociążonego czerpaka o wadze 8 kg. Czerpak można opuszczać na stalowej linie przez żurawik zaburtowy lub ręcznie na miękkiej linie. Przy dnie należy zwolnić tempo opuszczania w celu zminimalizowania fali uderzeniowej.

Zawartość czerpaka, po wydobyciu na pokład jednostki pływającej, przełożyć do plastikowego worka o pojemności 30–40 litrów, wrzucić karteczkę identyfikacyjną, worek zawiązać i odstawić w bezpieczne miejsce.



Wszelkie informacje oraz uwagi należy zanotować w karcie poboru prób (załącznik 1). Do tego celu zaleca się stosowanie ołówka, gdyż w razie zamoczenia karty nie rozmazuje się.

2.3. Przesiewanie prób na pokładzie

Czerpak van Veen

Po wyjęciu kraty, na płuczkę należy założyć wiadro z sitem. W przypadku, gdy osad jest zbity (głina, il itp.), należy rozbić go strumieniem wody z węża do uzyskania zawiesiny. Zawartość płuczki należy stopniowo przelewać przez sito kontrolując wielkość strumienia wody przez podnoszenie lub opuszczanie płuczki. Należy unikać kierowania strumienia wody bezpośrednio na sito. Strumień wody powinien rozbijać się o ścianę wiadra z sitem (fot. 6).

W przypadku zatykania się sita (poziom wody w sicie wzrasta) czynność należy natychmiast przerwać i zawartość sita ponownie umieścić w płuczce lub udrożnić sito kierując strumień wody z węża od dołu sita (fot. 7).

Gdy cała zawartość płuczki znajdzie się w sicie, należy ją przełożyć do pojemnika. W przypadku niewielkiej objętości osadu w sicie zaleca się użycie delikatnego strumienia bieżącej wody, kierowanego z drugiej strony sita (np.



Fot. 6. Sposób postępowania z płuczką (strumień wody powinien być kierowany na ścianki)



Fot. 7. Sposób postępowania z zatkany sitem

tryskawki z wodą) w celu wypłukania osadu do pojemnika. Gdy otwór pojemnika jest niewielki, zaleca się zastosowanie lejka.

W przypadku, gdy ilość osadu jest większa, można w pierwszej fazie użyć plastikowej łyżki, uważając by nie uszkodzić delikatnych osobników. Łyżka nie powinna mieć kontaktu ze ściankami wiadra, a szczególnie z sitem w celu uniknięcia efektu rozcierania osobników.

Po przełożeniu zawartości sita do pojemnika należy upewnić się, czy w oczkach sita nie pozostały drobne organizmy. W przypadku zakleszczenia się osobników, np. skąposzczetów, wieloszczetów w oczkach sita, należy delikatnie – przy użyciu pęsety – wyjąć osobniki i przełożyć je do pojemnika.

Pojemnik z osadem zamknąć, zabezpieczyć do czasu pobrania wszystkich prób z ppk.



- Standardowe sito powinno być wykonane z metalowej siatki (stal nierdzewna, mosiądz lub brąz) o rozmiarze oczka 1,0 mm.
- Siatka powinna być regularnie sprawdzana w celu wykrycia uszkodzeń lub zużycia materiału.
- Każda próba powinna być osobno przesiewana, osobno przechowywana i osobno dokumentowana.
- Objętość każdej próby należy oszacować przed przesiewaniem. W tym celu można posłużyć się pojemnikiem miarowym lub linijką.
- Widoczne gołym okiem organizmy o delikatnej strukturze ciała np. wieloszczety, powinny być wybierane z próby przed i w czasie przesiewania. Kamienie i duże muszle, po opłukaniu, powinny być usunięte, aby zapobiec efektowi „mielenia” osobników w trakcie płukania i przesiewania próby.
- Wszystkie pozostałości na sicie powinny być spłukane wodą aplikowaną od dołu sita. Łyżki i inne narzędzia do przenoszenia prób muszą być stosowane delikatnie.

Czerpak Günther

Próby pobrane czerpakiem Günther nie wymagają przesiewania na pokładzie. Worki z próbami powinny być dostarczone do laboratorium i przechowywane w temperaturze około 4°C w czasie nie dłuższym niż 24 godziny od momentu poboru do przesiewania próby.

2.4. Oznaczanie pojemników i konserwacja prób

Próby należy opisać i zakonserwować bezpośrednio po zakończeniu poboru na ppk. Do pojemników z próbami należy włożyć pergaminową kartkę identyfikacyjną (fot. 8) z:

- nazwą ppk i kolejnym numerem próby, np. T18. trzeci czerpak – „T18(3)”;
- datą poboru;
- w przypadku, gdy objętość próby jest większa niż pojemność pojemnika, oznaczeniem liczby pojemników, w których znajduje się jedna próba, np., gdy trzecia próba z ppk T18. jest obfita i mieści się w dwóch pojemnikach, to mają one oznaczenie: „T18(3)1/2” i „T18(3) 2/2” (ppk T18; trzeci czerpak, pojemnik pierwszy z dwóch i ppk T18; trzeci czerpak, pojemnik drugi z dwóch).



- Karteczki powinny być wykonane z kalki technicznej lub pergaminu; dodatkowo można zabezpieczyć je wkładając do małych torebek z hermetycznym zamknięciem.
- W laboratorium zawartości pojemników „T18(3)1/2” i „T18(3) 2/2” będą połączone i traktowane jak jedna próba.



Fot. 8. Opisywanie próby na pergaminowej kartce

Informacja z karteczki identyfikacyjnej powinna być również zapisana wodoodpornym pisakiem na pojemniku z próbą. Bardziej szczegółowe informacje o poborze prób należy zapisać w karcie poboru prób.

Próby makrozoobentosu, po zakończeniu przesiewania i oznaczeniu pojemników, powinny być zakonserwowane. Zaleca się użycie 40% zbuforowanego roztworu formaldehydu w ilości zapewniającej uzyskanie 4% roztworu w objętości próby w pojemniku. Dopuszcza się stosowanie do konserwacji 96% etanolu. Jego stężenie w próbce powinno wynosić około 80%.



- Należy odlać przez sito nadmiar wody w pojemniku z próbą (nad osadem powinna pozostać warstwa wody nie większa niż 1 cm). Do pojemnika, przy użyciu strzykawki lub innego przyrządu dozującego, należy wlać 1 część 40% roztworu formaldehydu na 9 części wody i znajdującego się tam osadu, np. 40 ml formaliny na ok. 1 litr próby.
- Makrozoobentos powinien być przechowywany w buforowanym 4% roztworze formaldehydu (formaliny). Do buforowania należy stosować 100 g sześćcio-metyleno-czterooaminy (urotropina) na 1 dm³ 40% roztworu formaldehydu. Można też nasycić roztwór boraksem.
- Po zamknięciu pojemnika należy wstrząsnąć zakonserwowaną próbą.

3. Analiza laboratoryjna

Celem analizy laboratoryjnej prób makrozoobentosu jest określenie składu taksonomicznego, liczebności i biomasy (mokrej masy – m.m.).

Określanie suchej masy – s.m. (po 24 godzinnym suszeniu w 60°C) należy uznać za rozwiązanie opcjonalnie, gdyż wysuszony materiał biologiczny nie może być użyty w przypadku potrzeby ponownej weryfikacji taksonomicznej lub w celach szkoleniowych.

Laboratorium wykonujące analizy jakościowe i ilościowe makrozoobentosu powinno być wyposażone w następujący sprzęt i odczynniki (tab. 2).

Każda próba powinna być analizowana i raportowana oddzielnie wg karty wyników analizy laboratoryjnej (załącznik 2).

Zaleca się, aby zakonserwowane próby przed analizą laboratoryjną były przechowywane przez okres około 3 miesięcy w celu ustalenia się stałej masy organizmów.

Tabela 2. Wykaz podstawowych przyrządów i odczynników potrzebnych do przeprowadzenia analizy laboratoryjnej

Czynność	Sprzęt/ odczynnik	Uwagi
Barwienie	róż bengalski	Barwienie prób może być pomocne w przypadku występowania osobników o białej lub przezroczystej barwie, nie jest obligatoryjne.
Przeplukiwanie próby	sito o oczkach 1,0 x 1,0 mm	Sito metalowe lub plastikowe.
Podział na podpróby	dzielnik Folsoma (poj. około 5 litrów)	Nie zaleca się dzielenia prób. Stosować tylko w przypadku prób bardzo licznych (powyżej 1000 osobn.).
Sortowanie materiału	biała kuweta pojemniki plastikowe na osobniki pęseta mikroskop stereoskopowy szalki Petriego 4% zbuforowany roztwór formaldehydu/80% etanol	Większe fragmenty osadu (kamienie, bryły gliny) mogą być usuwane pęsetą. Kuweta służy do wstępnego sortowania, właściwe sortowanie wymaga użycia binokularu.
Identyfikacja taksonomiczna	mikroskop stereoskopowy pęseta igła preparacyjna szalki Petriego	
Oznaczanie liczebności	licznik	Przydatny w przypadku licznych prób.
Oznaczanie biomasy	waga analityczna z dokładnością do 0,001 g bibuła filtracyjna suszarka pęseta skalpel	
Zapisywanie wyników	karta wyników analiz laboratoryjnych	

3.1. Barwienie

W przypadku liczego występowania drobnych organizmów o przezroczystych tkankach dopuszcza się barwienie osobników, aby ułatwić sortowanie prób. Jednakże barwienie może spowodować trudności w oznaczaniu organizmów innych gatunków. Barwienie przed rozpoczęciem przebiegania próby należy wykonać w następujący sposób:

- dokładne przepłukanie próby na sicie o rozmiarze oczka mniejszym niż 0,5 mm;
- pozostawienie sita w roztworze Róż Bengalski ($1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ wody bieżącej + 5 g fenolu do ustalenia pH 4–5) przez 20 minut; próba szczelnie przykryta.



Róż Bengalski może być dodawany bezpośrednio do płynu konserwującego ($1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w roztworze 40% formaldehydu).

3.2. Przepłukiwanie próby

Przywiezione do laboratorium próby należy w pierwszej kolejności dokładnie przepłukać. Delikatnie przenieść zawartość pojemników/worków na sito, sprawdzając czy wewnątrz nie pozostał osad (fot. 9).



Fot. 9. Przenoszenie próby na sito



Fot. 10. Przepłukiwanie próby



Należy unikać kierowania strumienia wody bezpośrednio na sito (fot. 10).

Przepłukaną próbę należy ostrożnie przenieść na kuwetę (fot. 11) przy użyciu tryskawki. Należy dokładnie sprawdzić czy na sicie nie pozostały żadne osobniki. W takim wypadku osobniki delikatnie przenieść na kuwetę przy pomocy pęsety (fot. 12).



Fot. 11. Przenoszenie materiału z sita na kuwetę



Fot. 12. Wybieranie pozostałych na sicie osobników

3.3. Podział na podpróby

Podział prób na podpróby powinien być dopuszczony tylko w przypadku wyjątkowo licznych prób, w których liczebności przekraczają 1000 osobników. Dopuszczalne jest wówczas użycie urządzeń przeznaczonych do dzielenia prób, np. dzielnika Folsoma (Motodo, 1959).

Podzielenie próby powinno być udokumentowane w karcie wyników analizy laboratoryjnej przez podanie informacji, jaka część próby była analizowana.

3.4. Sortowanie materiału biologicznego

Przed sortowaniem materiału próbę należy przepłukać na sicie o rozmiarach oczek 1,0 x 1,0 mm pod bieżącą wodą. Sito odstawić na kilkanaście minut do naczynia z wodą w celu usunięcia medium konserwującego.

Po przepłukaniu małe porcje materiału powinny być przenoszone za pomocą plastikowej łyżeczki na szalkę Petri'ego. Przebieranie należy zawsze prowadzić przy użyciu optycznych urządzeń powiększających (lupa, binokular).

Wielkość porcji materiału przenoszona na szalkę powinna zapewnić widzialność płytki pod szalką. Niewielkie porcje materiału należy przegarniać ostrą pęsetą z jednego krańca szalki na drugi wybierając wszystkie osobniki (fot. 13). Czynność należy powtórzyć tyle razy, aby przynajmniej w dwóch kolejnych cyklach przegarniania nie były znajdowane następne, nie wysortowane dotychczas osobniki. Zaleca się w tej fazie stosowania różnego koloru tła płytki pod szalką, np. czarnego i białego.

Wybrane osobniki należy przenosić do pojemników/probówek w celu ich późniejszej identyfikacji. Na tym etapie zaleca się wstępne sortowanie osobników



Fot. 13. Przebijanie materiału pod binokulem



W celu spełnienia wymogów zapewnienia jakości procedur laboratoryjnych 30% przesortowanych prób powinno być ponownie przesortowanych przez inną osobę.

do oddzielnych pojemników wg grup taksonomicznych, co przyspieszy dalszą identyfikację (oddzielnie skorupiaki, małże, ślimaki itp.). Przesortowane próby, o ile nie będą oznaczane taksonomicznie tego samego dnia, należy zakonserwować 4% roztworem formaliny lub 80% etanolem.

3.5. Identyfikacja taksonomiczna

Analizę jakościową (skład gatunkowy) należy przeprowadzić przy użyciu mikroskopu stereoskopowego oraz specjalistycznych kluczy do oznaczania gatunków. Oznaczanie powinno być przeprowadzone do możliwie najniższej grupy taksonomicznej.

W przypadku wątpliwości oznaczeń zaleca się wykonywanie dokumentacji fotograficznej oraz przechowywanie zakonserwowanych okazów w celu weryfikacji oznaczeń taksonomicznych z innymi specjalistami.



Specjaliści z laboratoriów prowadzących monitoring morskich wód przybrzeżnych i przejściowych powinni spotykać się na regularnych (corocznych) warsztatach w celu rozwiązywania bieżących problemów metodycznych i trudności w oznaczeniach taksonomicznych.

3.6. Oznaczanie liczebności

Po rozdzieleniu na taksony (każdy w innej szalce) należy policzyć wszystkie osobniki poszczególnych taksonów; w przypadku licznej próby zaleca się stosowanie ręcznego licznika.

W przypadku stwierdzenia osobników uszkodzonych (zdefragmentowanych) za osobnika uznać należy tylko fragment z częścią głowową lub, w przypadku małży, z częścią zawiasu muszli połączonego z fragmentem tkanki ciała.



- Fragmenty tkanki osobników bez części głowowej, o ile da się ustalić ich przynależność taksonomiczną będą uwzględnione w szacowaniu biomasy gatunku/taksonu.
- Puste domki larw owadów czy wieloszczetów oraz puste muszle małży i ślimaków nie są osobnikami.
- Nie liczy się poroślowych organizmów kolonijnych należących do gromad Hydrozoa i Bryozoa oraz osobników pąkli *Balanus improvisus*. Należy odnotować ich obecność w karcie analizy wyników próby makrozoobentosu symbolem „+”.

3.7. Oznaczanie biomasy

Próby należy przechowywać co najmniej 3 miesiące przed przystąpieniem do ważenia. Pomiar biomasy powinien być wykonany osobno dla każdego taksonu, oddzielnie dla każdej próby (czerpaka).

Biomasa osobników każdego taksonu określa się jako mokłą masę (m.m.).

Mokłą masę określa się po przeniesieniu wszystkich osobników danego taksonu w próbę na bibułę filtracyjną. Osobniki należy przekładać na bibule do czasu, aż nie będą pozostawiać mokrego śladu. W przypadku małży należy otworzyć lub skruszyć muszlę w celu odsączenia wody z jamy płaszczowej. Małże należy ważyć z muszlami. Wszystkie osobniki taksonu po odsączeniu należy niezwłocznie przenieść na wagę analityczną i dokonać pomiaru mokrej masy z dokładnością 0,001 g (fot. 14).



Fot. 14. Oznaczanie biomasy



- Wieloszczety żyjące w domkach - rurkach z drobin osadu należy przed określeniem mokrej masy wyjąć z rurek.
- Nie określa się biomasy organizmów kolonijnych należących do gromad Hydrozoa i Bryozoa oraz osobników *Balanus improvisus*. Należy odnotować ich obecność w karcie analizy wyników próby makrozoobentosu symbolem „+”.

Suchą masę (opcjonalnie) określa się po wysuszeniu prób materiału biologicznego, dla którego dokonano pomiaru mokrej masy formalinowej. Suszenia dokonuje się w suszarce laboratoryjnej w 60°C w ciągu 24 godzin; do osiągnięcia stałej wagi. Materiał po wyjęciu z suszarki powinien być natychmiast ważony z dokładnością 0,001 g.

3.8. Zapisywanie wyników

Wyniki analizy jakościowej (skład taksonomiczny) i ilościowej (liczebność i biomasa) należy na bieżąco zapisywać w karcie wyników (załącznik 2).

Dane wprowadzone do bazy danych/arkusza kalkulacyjnego komputera muszą być zweryfikowane przez porównanie wydruku z wynikami oryginalnych zapisów na kartach analiz laboratoryjnych.

4. Lista taksonów notowanych w wodach przybrzeżnych i przejściowych

SPONGIARIA

Ephydatia fluviatilis Linnaeus

HYDROZOA

Cordylophora caspia (lacustris) Pallas

Laomedea flexuosa Adler

Laomedea loveni Allman

TURBELLARIA

Dendrocoelum lacteum Müller

Planaria torva Müller

NEMERTINEA

Prostoma obscurum Schultze

NEMATODA

Non det.

POLYCHAETA

Harmothoe sarsi Malmgren

Hediste (Nereis) diversicolor Müller

Pygospio elegans Claparède

Marenzelleria neglecta Sikorski & Bick

Fabricia sabella Ehrenberg

Manayunkia aestuarina Bourne

OLIGOCHAETA

Non det.

CRUSTACEA

Balanus improvisus Darwin

Neomysis integer Leach

Praunus inermis Rathke

Sphaeroma hookeri Leach

Sphaeroma rugicauda Leach

Cyathura carinata Kröyer

Idotea chelipes (viridis) Pallas

Idotea balthica Pallas

Jaera sp.

Gammarus zaddachi Sexton

Gammarus locusta L.

Gammarus oceanicus Segestråle

Gammarus salinus Spooner

Gammarus duebeni Liljeborg
Gammarus tigrinus Sexton
Gammarus ineqicauda Stock
Pontogammarus robustoides Sars
Bathyporeia pilosa Lindström
Leptocheirus pilosus Zaddach
Corophium volutator Pallas
Crangon crangon Linnaeus

INSECTA larvae

Non det.

GASTROPODA

Hydrobia ulvae Pennant
Potamopyrgus jenkinsi Smith

BIVALVIA

Mytilus edulis trossulus Gould
Cardium (Cerastoderma) glaucum Poiret
Macoma balthica Linnaeus
Mya arenaria Linnaeus

BRYOZOA

Electra crustulenta Pallas

5. Rekomendowana literatura

- Bick A., Gosselck F. 1985. Arbeitsschlüssel zur Bestimmung der Polychaeten der Ostsee; Identification Key for the Polychaetes of the Baltic Sea. Mitt. Zool. Mus. Berl. 61 (1985) 2 171–272.
- Hayward P.J. Ryland J.S. 1995. Handbook of the marine fauna of North-West Europe. Oxford University press
- HELCOM. 1988. Guidelines for the Baltic Monitoring Programme for the third Stage. Part D. Biological Determinands. Baltic Sea Environment Proceedings. BMEPC Helsinki.
- Jagnow B., Gosselck F. 1987. Bestimmungsschlüssel für die Gehäuseschnecken und Muscheln der Ostsee; Identification Key for the Sea Shells of the Baltic. Mitt. Zool. Mus. Berl. 63 (1987) 2 191–268.
- Motodo S. 1959. Devices of simple plankton apparatus. Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 7:73–94.
- Rumohr H., Brey T., Ankar S. 1987. A compilation of biometric conversion factors for benthic invertebrates of the Baltic Sea: BMB Publ. No. 9: 69 pp.
- Żmudziński L. 1990. Świat zwierzęcy Bałtyku. Wyd. Szkol. i Pedagog. Warszawa
- Żmudziński L., 1999, Obunogi Amphipoda Bałtyku – klucz do oznaczania, WSP Słupsk Inst. Biol. Ochrony Środ., Zakł. Ekol. Ochr. Morza, 43 pp.

Załącznik 1

KARTA POBORU PRÓB MAKROZOOBENTOSU

Data:
Godz. wypłynięcia/powrotu
Osoby dokonujące poboru
Jednostka pływająca

Rodzaj systemu namiarowego
Warunki pogodowe/stan morza
Przyrząd poboru/powierzchnia poboru
Uwagi

Nazwa ppk	Liczba powtórzeń	Głębokość	Opis osadu (*)	Objętość pobranego osadu	Uwagi

(*) podać rodzaj osadu w czerpaku: kamienisty, żwirowy, piaszczysty, mulisty (ewentualne kombinacje, np. piaszczysto-mulisty)

Podpis osoby wypełniającej

Załącznik 2

KARTA WYNIKÓW ANALIZY PRÓBY MAKROZOOBENTOSU
[L – liczebność osobników w próbie; m.m. – mokra masa w gramach]

Nazwa ppk
Numer próby
Data poboru
Przyrząd poboru/ powierzchnia poboru
Data analizy
Uwagi
.....
.....

Lp.	Takson	L	m.m.
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Podpis osoby wypełniającej