

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Кубанский государственный университет»



На правах рукописи

ЕРМАКОВА ЯНА СТАНИСЛАВОВНА

**ОЦЕНКА НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ
АЗОВСКОГО МОРЯ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССОВ ЕГО ТРАНСФОРМАЦИИ
И БИОГЕННОГО ФОНА**

03.02.08 – Экология (химические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Корпакова Ирина Григорьевна,
доктор биологических наук, профессор

Краснодар 2019

Оглавление

| | |
|---|----|
| Введение..... | 4 |
| 1. Литературный обзор | 8 |
| 1.1 Состав, свойства и поведение нефти и нефтепродуктов при поступлении в водные объекты | 8 |
| 1.2 Источники и влияние нефтяного загрязнения на экологическое состояние водных объектов..... | 9 |
| 1.3 Методические аспекты определения основных компонентов (углеводородов, смол и асфальтенов) нефти в воде..... | 11 |
| 1.4 Формирование углеводородного фона водных объектов | 16 |
| 1.4.1 Антропогенные углеводороды | 17 |
| 1.4.2 Петрогенные углеводороды..... | 19 |
| 1.4.3 Естественные (биогенные) углеводороды..... | 20 |
| 1.5 Аналитические проблемы дифференциации антропогенных и естественных (биогенных) углеводородов | 23 |
| 1.6 Расчет биомассы фитопланктона по концентрации хлорофилла "a" | 26 |
| 1.6.1 Сравнительная характеристика методов определения хлорофилла "a" в природных водах..... | 27 |
| 1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования | 36 |
| 2. Экспериментальная часть и обсуждение результатов | 38 |
| 2.1 Материалы, реактивы и используемое оборудование..... | 38 |
| 2.2 Методические особенности определения углеводородного загрязнения водных объектов | 41 |
| 2.3 Генезис углеводородов в водных объектах Азовского бассейна..... | 51 |
| 2.4 Определение углеводородов в липидных фракциях | 66 |
| культивированных видов фитопланктона | 66 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.5 | Определение хлорофилла "a" в морских и пресных водных объектах | 75 |
| 2.5.1 | Выбор условий определения хлорофилла "a" в воде..... | 76 |
| 2.5.2 | Метрологическая характеристика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "a" в водах..... | 86 |
| 2.6 | Определение УВ с учетом процессов их трансформации и происхождения | 87 |
| 2.6.1 | Апробация схемы оценки содержания биогенных углеводов в пресных и морских водных объектах | 90 |
| | Выводы | 101 |
| | Список сокращений | 103 |
| | Список литературы | 104 |
| | Приложение | 123 |

Введение

Повсеместное распространение компонентов нефтяного загрязнения, участие их в физико-химических и биохимических процессах, отрицательное влияние на водные организмы, обуславливает важное значение наблюдений за содержанием компонентов нефти и нефтепродуктов при анализе состояния водных экосистем. Поэтому в рамках национальных и международных программ по защите окружающей среды нефть и нефтепродукты включены в перечень приоритетных показателей, подлежащих систематическому наблюдению и контролю [1, 2].

Осуществление контроля нефтяного загрязнения элементов водных экосистем относится к одной из самых трудных аналитических задач, стоящих перед специалистами при проведении экологического мониторинга загрязнения пресных и морских водных объектов. Основными проблемами оценки нефтяного загрязнения являются, во-первых, сложность, неопределенность и постоянная изменчивость состава нефти и нефтепродуктов при поступлении их в воду и, во-вторых, присутствие в природных водах углеводородов (УВ), продуцируемых водными организмами, так называемых биогенных УВ. Вторая проблема в настоящее время становится все более актуальной в связи с уменьшением сброса нефти и нефтепродуктов, которое отмечается для всего Мирового океана. При этом количество биогенных УВ остается практически постоянным и по некоторым оценкам превышает количество антропогенных УВ в 4-5 раз [3].

Актуальность исследования. Углеводородное загрязнение пресных и морских водных объектов при проведении мониторинга относят преимущественно к нефтяным загрязнениям антропогенного характера. Экосистема Азовского моря из-за значительной площади водосбора и большого объема водного стока намного быстрее реагирует на колебания антропогенных нагрузок и изменения экологической ситуации, чем другие водные объекты бассейна. Накопление устойчивых компонентов нефтяного загрязнения в воде и

донных отложениях изучаемой водной экосистемы представляет серьёзную опасность для её обитателей.

В силу ограниченности понятия «нефтепродукты» суммой неполярных и малополярных соединений, растворимых в гексане, подавляющее число методик определения «нефтепродуктов» в объектах природной среды основано на измерении оптических характеристик углеводородов, таких как поглощение в инфракрасной области спектра или интенсивность люминесценции после их отделения от остальных нефтяных компонентов и мешающих веществ. Т.е. проводится оценка не нефтяного, а углеводородного загрязнения исследуемого водного объекта, которая может значительно расходиться в зависимости от использования для регистрации той или иной оптической характеристики. Основными проблемами оценки нефтяного загрязнения являются сложность, неопределенность и постоянная изменчивость его состава при поступлении в воду, а также присутствие в природных водах углеводородов (УВ), продуцируемых водными организмами. Эти углеводороды, называемые биогенными или природными УВ, относятся к постоянным компонентам органического вещества всех геосфер, поскольку входят в состав липидных фракций подавляющего большинства водных организмов. Поэтому адекватная оценка уровня нефтяного загрязнения водной экосистемы возможна только с учетом биогенного (природного) углеводородного фона воды исследуемого объекта, что требует комплексного подхода к регистрации и дифференциации нефтяных и биогенных углеводородов в исследуемой водной экосистеме.

Целью научной работы - оценка загрязнения водной экосистемы Азовского моря углеводородами различного происхождения с учетом трансформации состава нефти и нефтепродуктов, а также наличия биогенного (природного) углеводородного фона.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- анализ методических особенностей определения углеводородов в воде;
- изучение генезиса углеводородов в водных объектах Азовского моря;

- изучение качественного и количественного состава углеводов в липидных фракциях фитопланктона;
- обоснование и разработка методики определения хлорофилла "а" в воде пресных и морских объектов для расчета биомассы фитопланктона;
- оценка загрязненности углеводородами водной экосистемы Азовского моря и их дифференциация.

Научная новизна. В диссертационной работе рассмотрены методологические аспекты оценки нефтяного загрязнения водных экосистем, обусловленные многокомпонентностью и непостоянством состава нефти и нефтепродуктов после поступления в водный объект. Предложен алгоритм оценки нефтяного загрязнения водных экосистем по соотношению углеводов с различной устойчивостью к процессам трансформации. Выявлены основные типы распределения углеводов в процессе генезиса парафиновых углеводов в воде Азовского моря.

Изучен качественный и количественный состав углеводов, содержащихся в липидных фракциях массовых видов фитопланктона исследуемой водной экосистемы, на основании которого обоснован методический подход по оценке вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы по биомассе фитопланктона, рассчитываемой по концентрации в нем хлорофилла "а".

Практическая значимость. Рассмотрены области применимости различных методик определения нефтепродуктов, допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга, на примере полученных экспериментальных данных мониторинга нефтяного загрязнения водной среды Азовского моря.

Для оценки вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы разработана экстракционно-флуоресцентная методика определения хлорофилла "а" в воде, позволяющая регистрировать концентрации пигмента в диапазоне от 0,1 мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в природных водах различной трофности. Разработанная методика включена в реестр Федерального

информационного фонда по обеспечению единства измерений - ФР.1.31.2019.33562.

Результаты диссертационной работы обсуждались на III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, 2017 г.), 22-й международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (г. Пушкино, 2018 г.), V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (г. Краснодар, 2018 г.), 23-й международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (г. Пушкино, 2019 г.), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (г. Санкт – Петербург, 2019 г.).

Исследования проводились в рамках выполнения проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ и гранта РФФИ (№ 16-43-230302р_а) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского госуниверситета.

1. Литературный обзор

1.1 Состав, свойства и поведение нефти и нефтепродуктов при поступлении в водные объекты

В нефти и нефтепродуктах обнаружено более 1000 соединений, включающих как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения различной химической природы: углеводороды (насыщенные и ненасыщенные алифатические, нафтеновые, ароматические, полициклические ароматические), высокомолекулярные ненасыщенные гетероциклические соединения, представленные смолистыми и асфальтеновыми компонентами, а также многочисленные кислородные (спирты, фенолы, жирные нафтеновые и ароматические кислоты, альдегиды, сложные эфиры и т. д.), азотистые (органические основания, производные пиридина, хинолин, амины, аминокислоты и т. д.), соединения серы (свободная сера, сероводород, меркаптаны, сульфиды, дисульфиды, полисульфиды, тиофен и его производные). В различных сортах нефти и нефтепродуктов, определенные компоненты могут находиться в широком диапазоне [7].

Наиболее изученным классом являются предельные (парафиновые) углеводороды (C_nH_{2n+2}). В настоящее время в нефти найдены парафиновые углеводороды от C_1 до C_{40} , как нормального, так и изо- строения. В различных типах нефти и нефтепродуктов содержание парафинов в углеводородной фракции с температурой кипения от 40-230 °С, варьирует в широком диапазоне [8]. Циклопарафиновые (нафтеновые) углеводороды (C_nH_{2n}) присутствуют в сырой нефти в количествах от 25 до 75 %. Большинство из них являются моноциклическими, однако, во фракциях, кипящих при высоких температурах, обнаружены соединения с шестью и более кольцами. Наиболее широко представлены циклопентановые и циклогексановые углеводороды. Из ароматических углеводородов в наибольших количествах присутствуют бензол и его гомологи, их содержание в нефти из разных месторождений колеблется от 5

до 25 %. Значительная часть углеводородов имеет гибридное строение. Число изомеров гибридных углеводородов очень велико, так как в их структуру могут входить ароматические кольца и парафиновые цепи [4, 6, 8].

Смолисто-асфальтеновые вещества относятся к высокомолекулярным гетероорганическим соединениям нефти, которые одновременно включают углерод, водород, кислород, серу, а часто азот и металлы. Не менее 93-95 % кислорода, а также почти весь азот и сера, которые содержатся в сырой нефти, сконцентрированы в смолистых веществах. Содержание смолисто-асфальтеновых компонентов может достигать до 40 % и более [9].

Нефть и нефтепродукты при попадании в водоем, в отличие от большинства других загрязнителей, распределяются в различные формы миграции: в виде поверхностной пленки, эмульгированном, растворенном и сорбированном донными отложениями состоянии. На распределение нефти и нефтепродуктов в водной среде влияют растворимость, вязкость, поверхностное натяжение, плотность отдельных нефтяных компонентов, а также природные факторы: температура, соленость, ветер и скорость течения [10 - 12].

1.2 Источники и влияние нефтяного загрязнения на экологическое состояние водных объектов

К основным источниками нефтяного загрязнения водных объектов относятся речной сток, сточные воды предприятий, расположенных на прибрежных территориях, сбросы буровых растворов и шламов при бурении нефтегазовых скважин, дампинг загрязненных донных отложений портовых акваторий, судоходство, атмосферные осадки и эоловые выпадения. Хроническое загрязнение водных экосистем углеводородами вносят до 70 % антропогенной нагрузки в морскую среду во всем мире [13].

Интенсификация деятельности водного транспорта, увеличение объемов перевозок различных грузов, особенно сырой нефти и нефтепродуктов, привели в последние годы к увеличению разгрузочно-погрузочных работ в портах. Объем

перевалки грузов в портах Азово-Черноморского бассейна в 2015 г. составил 203.7 млн. т., в т. ч. сухих грузов – 80.9 млн. т, наливных – 122.8 млн. т.

Наибольшие утечки нефти и нефтепродуктов связаны с транспортировкой по морю из районов добычи. Половина от количества добываемой на шельфе нефти обеспечивается танкерным флотом и оценивается до 2 млрд. т. в год. Каждый год во время обычных морских перевозок нефти, при авариях и незаконных сбросах в океан попадают примерно 600 000 т. нефти [14]. Общий вклад в загрязнение морских акваторий при транспортировке нефти и нефтепродуктов составляет порядка 20 %, при этом вклад при бурении и эксплуатации скважин не превышает 0.2% [15].

В современный период через порты Черного моря осуществляется экспорт российского и казахстанского нефтяного экспорта, который превышает 100 млн. тонн нефти и нефтепродуктов. Согласно данным спутникового мониторинга северо-восточной части Черного моря, проводимого НИЦ «Планета», в акватории моря часто наблюдаются разливы нефти и нефтепродуктов, сбрасываемых с судов [16].

В акватории Азовского и Черного морей с 2000 г. проводятся работы по разведке нефтяных месторождений. Запасы углеводородного сырья в восточной части Азовского моря оцениваются в 1.5 млрд. т. на 1 км², а в Туапсинском районе в восточной части Черного моря от 3.0 млрд. т. до 11.5 млрд. т. [17].

Опасность загрязнения водных объектов нефтью и нефтепродуктами связана с присутствием в них соединений, представляющих угрозу, как для жизни водных организмов, так и для их функционального состояния [18]. Предельные и непредельные углеводороды обладают наркотическим действием, а ароматические углеводороды являются опасными ядами [19, 20].

Нефтяные углеводороды, поступая в живые организмы (биосорбция, ассимиляция с пищей и др.) включаются в сложную цепь биохимических превращений с участием ферментных систем, способных существенно изменить химическую структуру исходных соединений, превращая их в метаболиты. Такие

превращения возникают на фоне биосинтеза и биохимической динамики других природных углеводов в органах и тканях живых организмов [21].

Морские организмы можно условно разделить на две группы, для первой группы нефть не только не токсична, но и служит источником углерода и энергии. Возможно, это связано с тем, что в процессе эволюции у ряда морских обитателей выработалась способность к включению нефтяных углеводов в метаболизм организма [22]. Для второй группы гидробионтов нефть является поражающим фактором. Смертность морских организмов наблюдается сразу на начальных стадиях нефтяного разлива. По мере диспергирования, разбавления и деградации нефти в морской среде токсичность её снижается. Наиболее серьезные и долговременные экологические нарушения возникают после разливов в прибрежном районе, когда нефть выносится на берег и на мелководье с замедленным водообменом [23].

Взаимодействие УВ с гидробионтами характеризуется сложностью и многофакторностью биохимических процессов, которые в итоге определяют накопление и метаболизм этих веществ в организме. Попадая в морские организмы, поток нефтяных углеводов по-разному распределяется по органам и тканям гидробионтов, в частности накапливаясь в липидных фракциях. Возвращение нефтяных УВ в морскую воду происходит после гибели гидробионтов. Поскольку накопление углеводов коррелирует с содержанием жира в тканях рыб, то глубокие нарушения в большей степени будут выражены у рыб, отличающихся повышенным уровнем жиров и липидов в органах и тканях. В экспериментах с фитопланктоном установлено, что наиболее устойчивы к нефтяным загрязнениям — зеленые водоросли, наименее — планктонные виды сине-зеленых, вызывающих «цветение» воды [24, 25].

1.3 Методические аспекты определения основных компонентов (углеводородов, смол и асфальтенов) нефти в воде

Несмотря на многочисленные исследования, Проблема оценки уровня нефтяного загрязнения водных объектов постоянно усложняется по мере получения новой информации о трансформации компонентов нефти, происходящей под влиянием сложных, постоянно меняющихся физико-химических, биохимических и других процессов, приводящих к радикальному изменению их исходного состава.

Большую путаницу вносят также термины, используемые для оценки уровня нефтяного загрязнения. Сложность осуществления аналитического контроля содержания нефтепродуктов в природных водах заставила специалистов в 1968 г. искусственно упростить понятие «нефтепродукты», ограничив его углеводородной фракцией [26, 27]. Понятие "нефтепродукты" не включает высокомолекулярные соединения, наиболее устойчивые к процессам трансформации- смолы и асфальтены, негативное воздействие которых носит долгосрочный характер и может привести к мутагенным и канцерогенным изменениям в жизненно важных органах водных организмов.

Позднее наряду с термином «нефтепродукты» появился термин «нефтяные углеводороды», который фактически отражает суммарное количество углеводородов независимо от их происхождения. В последнее время загрязнение водных объектов нефтью и нефтепродуктами определяется термином «углеводородный индекс» (hydrocarbon index), отражающий в наиболее полной мере количество фактически определяемых соединений, к которым относятся углеводороды как антропогенного, так и природного происхождения.

Практически отсутствуют работы, посвященные разработке методик определения доли биогенных УВ в водных объектах. Все существующие методики определения нефти и нефтепродуктов в воде регистрируют суммарное содержание углеводородной фракции независимо от происхождения [28].

В связи с ограничением понятия «нефтепродукты» предварительное отделение углеводородной фракции от мешающих веществ и более полярных компонентов нефти и нефтепродуктов является обязательной стадией всех методик определения уровня нефтяного загрязнения природных вод. Наибольшее

развитие получили методики, основанные на измерении интенсивности люминесценции и поглощения в инфракрасной области спектра углеводородов после отделения их от остальных компонентов нефти и нефтепродуктов и мешающих веществ методами колоночной или тонкослойной хроматографии [29 - 35].

Преимуществом колоночной хроматографии является возможность определения углеводородов с учетом летучих компонентов, что важно при свежих разливах нефти или нефтепродуктов. При хроническом загрязнении летучие УВ практически отсутствуют – более 50 % испаряется уже в первые 5 часов после разлива [6]. Однако при использовании очистки экстракта через колонку с оксидом алюминия II степени активности, что предусмотрено большинством методик, теряются наиболее стойкие к процессам деградации полициклические ароматические УВ, так как они необратимо сорбируются в колонке. Поэтому сочетание колоночной хроматографии с измерением интенсивности люминесценции может привести к заниженным результатам.

Метод тонкослойной хроматографии позволяет учитывать основные групповые компоненты нефти и нефтепродуктов, включая не только углеводороды, но и смолисто-асфальтеновые вещества, что особенно важно при хроническом загрязнении, которое характерно для большинства водных объектов. Использование тонкослойной хроматографии позволяет также идентифицировать источник загрязнения по интенсивности и цвету свечения хроматографической зоны углеводородов и фиксировать присутствие биогенных углеводородов по цвету люминесценции хроматографической зоны смолистых веществ [36].

Для количественного определения углеводородов, предварительно выделенных различными хроматографическими способами, наибольшее развитие получили методики, основанные на измерении интенсивности люминесценции и поглощения в ультрафиолетовой или инфракрасной области спектра [37, 38].

Углеводороды различных сортов нефти и нефтепродуктов представляют очень сложную и разнообразную смесь соединений отдельных классов, обладающих существенно различающимися между собой оптическими

свойствами, положенным в основу методик измерения. Результаты определения УВ оптическими методами в значительной степени зависят от соответствия состава стандарта составу УВ, присутствующих в исследуемых объектах. Поэтому выбор стандартной смеси для построения градуировочной зависимости относится к наиболее сложному и важному вопросу, определяющему адекватность получаемых результатов.

Присутствие в молекулах ароматических углеводородов замкнутых сопряженных связей, в которых π -электроны смещаются вдоль сопряженной системы, требуют меньшей энергии для перехода молекулы в возбужденное состояние, чем для молекул с одинарной связью. С увеличением числа циклов энергия возбуждения молекул уменьшается, и спектры поглощения и флуоресценции смещаются в сторону длинных волн. Таким образом, способность углеводородной фракции нефти и нефтепродуктов люминесцировать обусловлена ароматическими, главным образом, полициклическими углеводородами. Спектры возбуждения и люминесценции УВ характеризуются сплошными широкими полосами, соответственно, в областях 320-460 нм и 420-600 нм. При этом максимумы длин волн возбуждения и люминесценции УВ, выделенных из нефти и элементов водных экосистем, различаются незначительно [39, 40].

Инфракрасные спектры поглощения различных видов нефти и нефтепродуктов характеризуются наличием полос поглощения валентных и деформационных колебаний С-Н, О-Н, С-О связей, присутствующих в алифатических, ароматических, алициклических углеводородах, эфирах, фенолах, кислотах и др. Для количественного определения УВ наибольший интерес представляют интенсивные полосы поглощения в области $3000-2800\text{ см}^{-1}$, обусловленные валентными колебаниями С-Н связей. Данные полосы поглощения проявляются в виде четырех пиков при 2962 и 2872 см^{-1} , характерные для ассиметричных и симметричных валентных колебаний С-Н связей метильной группы и при 2926 и 2853 см^{-1} , характерные для ассиметричных и симметричных валентных колебаний С-Н связей метиленовой группы. Относительные

интенсивности этих четырех полос зависят от отношения числа метильных групп к числу метиленовых групп [7, 41].

Способность нефти и нефтепродуктов поглощать в УФ области спектра связана с наличием ароматических структур и структурных групп с сопряженными π -связями. Различные классы УВ по-разному проявляют эту способность. Моноциклические углеводороды имеют максимумы поглощения в области 255-275 нм, бициклические 275-290 нм, полициклические – 240-260 нм. Общий вид кривых поглощения нефти и нефтепродуктов представляет собой гиперболические кривые с наибольшими максимумами в области 250-270 нм. В связи с этим оптимальной длиной волны для измерения оптической плотности выбрана $\lambda = 254$ нм [42].

Из всех оптических методов несоответствие состава стандарта составу УВ, присутствующих в исследуемых объектах, в наибольшей степени влияет на результаты люминесцентного метода, в наименьшей степени – инфракрасного метода. Это связано с тем, что доля полициклических ароматических углеводородов, обеспечивающих люминесценцию углеводородной фракции чрезвычайно мала – от 0 до 6 %, доля поглощающих в УФ-области спектра ненасыщенных и ароматических углеводородов может достигать 40 %, а доля поглощающих в ИК-области спектра – 70-100 %.

Люминесцентный метод, несмотря на существенные погрешности, допускаемые за счет значительного разброса градуировочных графиков, построенных для различных образцов нефти и нефтепродуктов, широко используется в гидрохимической практике, так как фиксирует содержание наиболее опасных люминесцирующих полициклических ароматических углеводородов, многие из которых обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [43]. Основным преимуществом ИК-спектрометрического детектирования нефтепродуктов является довольно узкий разброс градуировочных графиков (± 12 %), но результаты, получаемые этим методом, могут быть сильно завышены при анализе высокопродуктивных водных объектов с низким уровнем нефтяного загрязнения [35]. С другой стороны, незначительная

зависимость этого метода от соответствия стандартного образца и исследуемых нефтепродуктов позволяет использовать в качестве стандарта искусственные смеси индивидуальных углеводородов. Недостатком используемых стандартных смесей для ИК-спектрометрического метода определения нефтепродуктов является отсутствие в их составе веществ, обладающих люминесцирующей способностью. Наиболее широко в мировой практике до настоящего времени используется смесь углеводородов, состоящая из 37.6 % гексадекана, 33.8 % изооктана и 28.6 % бензола, предложенная Симардом [44].

Выбор методики определения УВ должен зависеть от цели исследования и конкретной ситуации на водном объекте. В случае свежих нефтяных разливов целесообразно использовать сочетание метода колоночной хроматографии с ИК-спектрометрическим детектированием аналита. При хроническом загрязнении водных объектов, когда летучие компоненты уже испарились, более адекватную оценку нефтяного загрязнения можно получить, используя сочетание тонкослойной хроматографии с люминесцентными или спектрофотометрическими методиками детектирования.

Сложность и изменение состава и значительно отличающиеся свойства отдельных компонентов нефти, положенных в основу их количественного определения, приводит к существенному разбросу данных об уровне нефтяного загрязнения водного объекта, полученных в одни и те же сроки в аккредитованных аналитических центрах различными аттестованными методиками, включенным в Государственный реестр методик и допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга.

1.4 Формирование углеводородного фона водных объектов

Поскольку углеводороды относятся к постоянным компонентам органического вещества всех геосфер, в природных водах присутствует смесь УВ не только антропогенного, но и природного происхождения [45]. Поэтому при

оценке нефтяного загрязнения необходимо разделять природную и антропогенную составляющие. Без изучения фоновых углеводородных концентраций невозможно определить их вклад от антропогенных источников.

По классификации, проведенной Экспертной группой по различным аспектам загрязнения морской среды [46, 47], к основным источникам углеводородов относятся:

- синтез живыми организмами;
- нефть и нефтепродукты, поступающие при транспортировке и аварийных ситуациях;
- при выносе с суши бытовых и промышленных стоков и с флюидными потоками из морского дна в нефтегазоносных районах.

Углеводороды в водных объектах в зависимости от их источника можно разделить на группы [10]:

- антропогенные углеводороды (сточные воды, судоходство);
- петрогенные углеводороды (просачивание из донных осадков);
- автохтонные биогенные углеводороды (продуцированные планктонными организмами непосредственно в водных объектах);
- аллохтонные биогенные углеводороды (продуцированы растительностью терригенного происхождения, перенос с атмосферными осадками в водную среду).

1.4.1 Антропогенные углеводороды

Антропогенные потоки нефтяных углеводородов попадают в морскую среду за счет судоходства, аварийных ситуаций, сбросов промышленных и сточных вод, дампинга загрязненных донных отложений, переноса с суши нефтяных компонентов с атмосферными осадками и эоловыми выпадениями [48].

В процессе эволюции, за миллионы лет в природе выработался механизм самоочищения, при котором скорость образования углеводородов соответствовала скорости их деградации. Нефтеокисляющие микроорганизмы

способствуют «самоочищению» морских акваторий от нефти и нефтепродуктов [49, 50]. Например, в работе Yanto [50] описана биodeградация нефтяных углеводов штаммом бактерий *Pestalotiopsis* sp., которые разлагают все типы нефтяных углеводов (48–96 % в течение 30 дней) в жидкой среде при pH=4-5. Из-за сбалансированности этого процесса углеводороды не только не оказывали вредного воздействия на морскую среду, но и поддерживали ее стабильность. В связи с деятельностью человека, этот механизм был нарушен.

В настоящее время, по сравнению с естественными геохимическими процессами перераспределения различных классов химических соединений, влияние антропогенного фактора становится доминирующим. Элементы практически всех водных экосистем Земли в большей или меньшей степени подвержены негативному действию ксенобиотиков, что в первую очередь сказывается на водных биологических ресурсах [51].

Повышенные уровни углеводородного загрязнения отмечаются в районах с высокой численностью и биомассой водных организмов. Это морские, прибрежные и шельфовые районы, эстуарии, поверхности раздела фаз вода – атмосфера, вода - дно.

При проведении дноуглубительных работ, строительства портовых и гидротехнических сооружений, УВ, содержащиеся в донных отложениях, могут служить источником вторичного загрязнения морских вод. При повторном поступлении в морскую воду под воздействием сложных физических, химических и биохимических процессов, происходящих на поверхности раздела вода-донные отложения или вблизи него, связанные со взвешенными веществами УВ возвратятся в повторный цикл трансформаций. Промежуточные продукты распада компонентов нефтяного загрязнения часто более токсичны, чем исходные соединения [52].

Загрязнение антропогенными углеводородами происходит на фоне локальной природной геохимической обстановки, поэтому для объективной оценки антропогенного нефтяного загрязнения нужно учитывать фоновые концентрации УВ [46].

1.4.2 Петрогенные углеводороды

Существенный вклад в общий приток поступлений углеводородов вносит также просачивание с флюидами из морского дна нефтегазоносных районов, которые маркируются как “петрогенные УВ”.

Во многих морских районах обнаружены миграционные потоки углеводородов, вследствие их утечки через разломы и трещины из нефтегазоносных структур. Данный процесс происходит на площади, составляющей около 10-15 % от общей площади Мирового океана, в окраинных районах и внутриматериковых морях, где распространены нефтегазоносные бассейны [53]. Так поступление в море нефти с участка около 1.5 км в проливе Санта-Барбара (штат Калифорния) оценивается в 10-15 тонн в сутки [54]. Такие большие потоки углеводородов обусловлены малой глубиной залегания нефтеносных толщ, благоприятной тектонической и литологической обстановкой. В связи с недостаточной изученностью этого процесса, можно ориентировочно определить вклад углеводородов из региональных (рассеянных) флюидных потоков (очагов образования нефти и газа). Глобальное поступление нефти в морскую среду из-за просачивания с морского дна оценивается в 0.2-2 млн. тонн в год [3]. На арктическом шельфе России [55], природный источник обеспечивает не менее 50% от общего объема поступления нефти в арктические моря. Этот вывод подтверждается данными о распределении органического вещества в донных отложениях арктического шельфа России [56].

Данные о составе и фоновых концентрациях петрогенных углеводородов довольно противоречивы. В одних случаях сходство просачивающихся углеводородов с сырой нефтью обнаруживается, в других - наблюдается относительное увеличение доли разветвленных и циклических углеводородов, что обусловлено биodeградацией алканов в окисленных грубодисперсных отложениях [54].

Состав и величина потока петрогенных углеводородов зависит от глубины залегания нефтеносных пластов. Величина выносимых углеводородов составляет 600-1000 тыс. в год [46]. Поступление нефти за счет просачивания оценивается в среднем около 50 % от суммарного потока нефти в Мировой океан [3, 54]. Вопрос о дифференциации антропогенных и биогенных УВ очень важен, так как от этого фактора зависят мероприятия, необходимые для регулирования состояния экосистемы изучаемой территории.

Возможность появления петрогенных УВ не только в донных отложениях, но и водной толще, подтверждается данными космической радиолокации в различных районах Мирового океана, согласно которым на морской поверхности периодически наблюдаются скопления пятен нефти от подводных источников. При этом нефтепроявления обнаруживаются на морской поверхности даже при глубинах около 3000 м [57, 58].

1.4.3 Естественные (биогенные) углеводороды

Природные и нефтяные УВ характеризуются подобным составом, поэтому определение их происхождения является сложной проблемой и требует селективных методов исследования. Углеводороды, образованные в результате естественных процессов, принято называть естественными или биогенными углеводородами [59].

Биогенные органические соединения (БОС) – это общий термин, используемый для описания смеси органических соединений, включая алканы, стерины и стероны, жирные кислоты и жирные спирты, воски и сложные эфиры воска, биосинтезированные живыми организмами. К их источникам могут относиться растения, водоросли, бактерии и животные. Растения и водоросли продуцируют БОС в виде защитного воскового покрытия, которое высвобождается обратно в осадок в конце их жизненного цикла [60, 61].

В зависимости от происхождения УВ делятся на автохтонные, продуцированные планктонными организмами непосредственно в водных

объектах, и аллохтонные, продуцированные растительностью терригенного происхождения. К аллохтонным также относятся и УВ антропогенного происхождения, поступившие в водную среду при транспортировке нефти и нефтепродуктов, при выносе с суши и привнесенные атмосферными осадками.

В составе живых организмов можно выделить несколько групп биомолекул, сходных по строению и функциям, выполняемым ими в организмах: углеводы, белки, липиды, липоиды и родственные им вещества — панлипоиды. Число биомолекул вышеперечисленных групп, входящих в состав организмов разных классов, существенно отличается (таблица 1). В процессе образования биогенных углеводов основное значение имеет липидно-углеводородный комплекс, который является составной частью органических веществ.

Таблица 1 – Главные составные компоненты организмов [62]

| Класс организмов | Углеводы, % | Белки, % | Липиды, липоиды и родственные им вещества, % |
|------------------|-------------|----------|--|
| Зеленые растения | >50 | 7 | 2 |
| Фитопланктон | 36 | 48 | 16 |
| Зоопланктон | 5 | 75 | 20 |
| Бактерии | 20 | 60 | 20 |
| Споры | 42 | 8 | 50 |

У разных видов фитопланктона, в зависимости от видовой принадлежности, содержание углеводов, липидов и белков в расчете на сухую массу варьирует в широких пределах. Установлено, что для смешанного фитопланктона наличие общих липидов находится в диапазоне от 2 до 44 % [63 - 65].

Наряду с углеводами и белками, липиды - один из главных компонентов клеток животных, растений и микроорганизмов. Липиды, липоиды и

панлипоидины относятся к жизненно важным компонентам и выполняют в организмах различные функции. Эту группу соединений принято называть «липидами» [7, 66].

Основную долю в общую массу биогенных УВ вносит фитопланктон, ежегодно создающий $(70-103) \cdot 10^{15}$ г $C_{орг}$ [67]. Остальные организмы по уменьшению вклада располагаются в следующем порядке: бактериобентос > бактериопланктон > зоопланктон [34].

В процессе жизнедеятельности и после отмирания водорослей в водную среду попадают биогенные УВ. Вклад биогенных УВ в общей оценке нефтяного загрязнения водных объектов зависит от биопродуктивности водоема и от объема сбрасываемых или уже накопленных в элементах водных экосистем нефтепродуктов.

Гидробионты синтезируют различные виды углеводов. Однако в ряде случаев обнаруживали только несколько членов гомологического ряда, либо один доминирующий класс УВ, а иногда только отдельный УВ. В морском фитопланктоне в большом количестве содержатся н-алканы с 15, 17 и 21 углеродными атомами [68 - 70]. Ароматические УВ присутствуют в очень низких концентрациях и составляют менее 1% общего количества УВ в морских организмах [71].

В морских экосистемах бактерии также являются источником автохтонных углеводов, но имеют второстепенное значение в их формировании. Для них характерен гомологический ряд алканов с доминированием н- C_{16} , н- C_{20} – C_{25} . [46, 72]. Некоторые виды бактерий содержат н-алканы с нечетным числом атомов углерода (C_7 - C_{17}) и соответствующие жирные кислоты с четным числом атомов углерода (C_8 - C_{18}). Предполагают, что подобные УВ могли образоваться как в процессе декарбоксилирования жирных кислот с четным числом атомов углерода, так и являться непосредственными продуктами метаболизма бактерий [73, 74]

В местах массового цветения фитопланктона концентрация УВ может превышать величину предельно допустимой концентрации нефтепродуктов в водных объектах рыбохозяйственного значения и получаемая информация об

уровне нефтяного загрязнения исследуемого водного объекта оказывается некорректной [75, 76]. Поэтому адекватная оценка уровня нефтяного загрязнения может быть получена только с учетом биогенного (природного) углеводородного фона воды исследуемых объектов.

1.5 Аналитические проблемы дифференциации антропогенных и естественных (биогенных) углеводородов

Многие индивидуальные углеводороды, найденные в тканях гидробионтов, имеют тот же состав и строение, что и входящие в различные нефтяные фракции, поэтому провести дифференциацию их происхождения чрезвычайно трудно. Учет биогенных углеводородов в большинстве публикаций сводится, как правило, к поиску критериев их преобладания над антропогенными (нефтяными) углеводородами [18].

Известны основные признаки различия между нефтяными и биогенными углеводородами [77 - 79]:

– нефть содержит примерно равное количество углеводородов с четным и нечетным числом углеродных атомов. В водных организмах и высшей водной растительности доминируют углеводороды с нечетным числом углеродных атомов, в первую очередь – C_{15} , C_{17} , C_{19} и C_{27} , C_{29} , C_{31} ;

– нефть содержит большее количество ароматических углеводородов. В организмах отсутствуют гомологические ряды моно-, ди-, три- и тетраметилбензолов и моно-, ди-, три- и тетраметилнафталинов;

– нефть содержит ряд нафтено-ароматических углеводородов и гетеросоединений, содержащих серу, азот, кислород, металлы и тяжелые асфальтеновые вещества, которые отсутствуют в организмах.

Предложены критерии [2, 18, 47, 77, 80, 81], по которым можно определить преобладание нефтяных или биогенных УВ в общей сумме обнаруживаемых углеводородов в пробе:

- отношение пристана (2, 6, 10, 14-тетраметилпентадекан) к фитану (2, 6, 10, 14-тетраметилгексадекан) – Pr/Ph;
- отношение гептадекана к пристану – C_{17}/Pr ;
- отношение пентадекана к гексадекану – C_{15}/C_{16} ;
- отношение площади пиков разделенных соединений ($S_{\text{разд}}$) к площади «горба» – $S_{\text{разд}}/S_{\text{горба}}$ (в случае разделения сложной многокомпонентной смеси особенно трансформированных нефтяных УВ образуется так называемый неразрешенный пик (unresolved background envelope));
- отношение углеводородов с четным и нечетным числом углеродных атомов.

В качестве критериев происхождения углеводородов наиболее часто используется критерий CPI (Carbon Preference Index), так называемый индекс нечетности, который рассчитывается по отношениям углеводородов с нечетным и четным числом углеродных атомов. Однако по принятым критериям можно судить только о преобладании нефтяных или биогенных углеводородов, но не о количественном их содержании.

Отношение нечетных и четных алканов в низкомолекулярной области может служить индикатором интенсивности трансформации углеводородов микроорганизмами. Соотношение нечетных и четных n-алканов в высокомолекулярной области характеризует вклад аллохтонной (терригенной) составляющей биогенных УВ. Для аллохтонных углеводородов отношение нечетных к четным алканам всегда больше 1, так как в составе УВ высшей растительности значительно преобладают высокомолекулярные нечетные алканы. Отношение суммарных концентраций низкомолекулярных и высокомолекулярных n-алканов используется для характеристики соотношения между автохтонными УВ морского происхождения и аллохтонными УВ терригенного происхождения [46]. Аллохтонный вклад при анализе донных отложений может быть охарактеризован доминированием алканов n- C_{29} и n- C_{31} [82, 83].

Индекс нечетности - CPI в низко- и высокомолекулярной области, является наиболее эффективным критерием идентификации углеводородного загрязнения. Он определяется как общее количество n-алканов с нечетными числами углерода, разделенными на сумму n-алканов с четными числами углерода [46, 61, 84].

Критерий CPI рассчитывается по формуле (1):

$$CPI = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum C_{23-31}}{\sum C_{26-32}} + \frac{\sum C_{25-33}}{\sum C_{26-32}} \right) \quad (1)$$

При преобладании нефтяных углеводородов значения CPI равны или меньше 1, при преобладании биогенных углеводородов – больше 1 [46].

Известны единичные работы по количественной оценке содержания биогенных углеводородов в водных объектах. Одна из этих работ [85] основана на использовании отношения количества углеводородов и общего органического углерода, определенных на заведомо незагрязненном участке исследуемого водного объекта. Вторая работа [76] основана на измерении соотношения площадей и высот пиков на спектрах люминесценции смолистых веществ и хлорофилла. Оба этих подхода, к сожалению, не всегда могут решить задачу даже полуколичественной дифференциации нефтяных и биогенных углеводородов. Во-первых, в настоящее время невозможно найти участки водных объектов, не подверженных антропогенному воздействию, так как большое количество компонентов нефтяного загрязнения поступает с атмосферными осадками. Известно, что в атмосферных осадках присутствуют не только углеводороды всех классов, но и смолистые вещества [35]. Использование соотношения между количеством смолистых веществ и хлорофилла может привести к ошибочным результатам, поскольку относительные доли смолистых веществ и углеводородов, количество которых оценивается, изменяются в очень широком интервале [86].

Botello A. с соавторами [87] для определения нефтяных УВ в компонентах водной экосистемы предлагают вначале оценивать относительное количество

углеводородов биогенного происхождения. Для этого определяется фоновое содержание биогенных УВ, обнаруженных в морских организмах и отложениях. Предлагается установить распределение биогенных *n*-парафинов в «морских травах», бентических водорослях, беспозвоночных и недавних отложениях из лагуны Терминис, Кампече (Мексика). Учитывая высокую степень чистоты этого прибрежного региона, предлагается результаты этих исследований рассмотреть в качестве фонового показателя для оценки возможных антропогенных изменений.

Для определения доли биогенных углеводородов представляется возможным использовать данные о биомассе фитопланктона, попадающего в исследуемую пробу воды, а биомассу фитопланктона можно рассчитать по концентрации хлорофилла "а". Показатель хлорофилла в воде, является обязательным биологическим критерием для оценки качества природной воды в рамках «Единых критериев качества воды», принятых на совещании представителей стран СЭВ в 1982 году [88].

1.6 Расчет биомассы фитопланктона по концентрации хлорофилла "а"

Хлорофилл "а", как основной пигмент, обеспечивающий фотохимические восстановительные реакции, является важнейшим показателем биомассы фитопланктона. По концентрации хлорофилла "а" и особенностям его распределения в водной толще можно получить представление о качестве и биопродуктивности водоема. Существует закономерная связь, прямая пропорциональная зависимость, между количеством хлорофилла "а" и величиной продукции фитопланктона. Первичная продукция, образуемая фитопланктоном в процессе фотосинтеза, обуславливает развитие остального живого мира морей [89].

В литературе существует много работ, характеризующих линейную зависимость биомассы фитопланктона и содержания хлорофилла "а" в природных водах [90 - 93]. В анализе биомассы фитопланктона и содержания хлорофилла "а" в планктоне водохранилищ Волги также показана тесная линейная связь, между

этими показателями [94, 95]. Однако в ряде случаев связь хлорофилла "а" с биомассой аппроксимируется степенными уравнениями [96 - 99] или же линейный характер связи сохраняется до определенного предела величин, например, в оз. Дривяты до биомассы 20 мг/дм³ [99].

Содержание хлорофилла "а" в биомассе фитопланктона, по данным различных авторов, находится от 0.02 до 9.70 % [100 – 103]. В настоящее время нет единого мнения, чем обусловлены различия в удельном содержании хлорофилла "а" в фитопланктоне. Наиболее распространенные предположения, связаны с изменением таксономической структуры фитопланктона в водоеме под действием различных факторов [104]. Существует мнение, что удельное содержание хлорофилла в фитопланктоне зависит от размеров его представителей, и увеличение их размеров часто сопровождается уменьшением относительного содержания хлорофилла [105].

1.6.1 Сравнительная характеристика методов определения хлорофилла "а" в природных водах

Хлорофилл - сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина, у которой одна карбоксильная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а другая остатком одноатомного непредельного спирта фитола. Основу молекулы хлорофилла, составляет порфириновое кольцо. Оно состоит из четырех пиррольных пятичленных колец, соединенных между собой углеродными мостиками и образующих большое порфириновое ядро с атомами азота посередине, связанными с атомом магния. В молекуле хлорофилла есть дополнительное циклопентановое кольцо, которое содержит карбонильную, а также карбоксильную группы, связанные эфирной связью с метиловым спиртом (рисунок 1) [106].

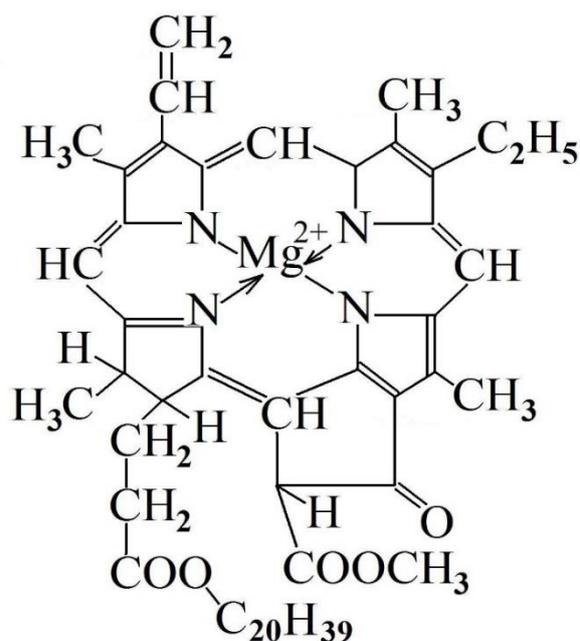


Рисунок 1 – Строение хлорофилла "a". Химическая формула $C_{55}N_{72}MgO_5N_4$

В природе в клетках растительных организмов существует множество разновидностей хлорофилла (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание фотосинтетических пигментов в водорослях и высших растениях [106]

| Подразделения | Хлорофилл | | | | |
|-----------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|
| | "a" | "b" | "c" | "d" | "e" |
| Высшие растения | + | + | - | - | - |
| Водоросли: | | | | | |
| Сине-зеленые (Cyanophyta) | + | - | - | - | - |
| Эвгленовые (Euglenophyta) | + | + | - | - | - |
| Зеленые (Chlorophyta) | + | + | - | - | - |
| Красные (Rhodophyta) | + | - | - | + | - |
| Пирофитовые (Pyrrhophyta) | + | - | + | - | - |
| Золотистые (Chrysophyta) | + | - | - | - | + |
| Желто-зеленые (Xanthophyta) | + | - | - | - | + |

Продолжение таблицы 2

| Подразделения | Хлорофилл | | | | |
|------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|
| | "a" | "b" | "c" | "d" | "e" |
| Бурые (Phaeophyta) | + | - | + | - | - |
| Диатомовые (Bacillariophyta) | + | + | - | - | - |
| Харовые (Charophyta) | + | + | - | - | - |

Хлорофилл "b" отличается от хлорофилла "a" тем, что содержит на два атома водорода меньше и на один атом кислорода больше (вместо группы CH_3 группа $\text{C}=\text{O}-\text{H}$).

По представлениям о механизме биохимического синтеза, для его осуществления обязателен лишь хлорофилл "a", участие других форм хлорофилла и растительных пигментов сводится к поглощению энергии света и передаче её той молекулярной системе основных реакций фотосинтеза, в которых необходимо участие хлорофилла "a" [107].

Для измерения концентрации хлорофилла "a" наиболее часто используется спектрофотометрический метод, который был разработан в 1930-1940 гг. [108]. Анализ пигментов основан на фильтрации исследуемых проб, экстракции органическим растворителем и последующем спектрофотометрическом определении. К наиболее известным спектрофотометрическим методам определения хлорофилла "a" относятся методики измерений массовой концентрации хлорофилла "a" с экстракцией этанолом [109, 110] и экстракцией ацетоном [111]. В некоторых работах описываются результаты экспериментов при использовании в качестве экстрагента метанола. Метанол способствует уменьшению времени экстракции и устранению необходимости кипятить или гомогенизировать образцы, тем самым, уменьшая значения погрешности [112-114]. Для выделения основного пигмента из пресноводных водорослей предложен метод с использованием волокнистых фильтров, в качестве экстрагента используется смесь уксусной кислоты с 90% этанолом [115]. Nianwei Qiu с

соавторами [116] разработали метод для быстрого извлечения хлорофилла "a", путем центрифугирования водорослей при 5000 об. при 4 °C в течение 15 мин, инкубированием при 65 °C в течение 1-2 ч в темноте с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО) и 90% ацетона. Этот метод позволяет сэкономить на стоимости фильтра и упростить процесс экстракции. В работе [117] отмечено, что количество общего хлорофилла, экстрагированного 90% ацетоном, выше и экстракт является более стабильным во времени, чем в случае с другими растворителями.

Для получения экстракта пробу воды фильтруют через мембранный фильтр GF/F с нанесенным слоем углекислого бария или магния, осадок размельчают (гомогенизируют). Считается, что добавление $MgCO_3$ не оказывает значимого эффекта и может приводить к абсорбции пигментов [108]. Пигменты экстрагируют водным ацетоном (90 %) и удаляют центрифугированием из экстракта светорассеивающую взвесь.

Хлорофиллы имеют две основные полосы поглощения спектра: одна в синей области (менее 460 нм) и одна в красной (630–670 нм). Наличие в спектре поглощения хлорофилла двух главных пиков свидетельствует о том, что существует два наиболее вероятных для данной молекулы синглетных уровня: более высокий при поглощении синего света и более низкий – при поглощении красного. Каждый поглощенный молекулой хлорофилла квант красного света переводит электрон из основного состояния в возбужденное, причем вся энергия кванта поглощается в этом процессе электроном. Поглощение кванта синего света переводит электрон в еще более возбужденное состояние, однако, попав на более высокий энергетический уровень, электрон падает обратно на «красную» орбиту, причем слишком быстро, чтобы совершить при этом какую-либо полезную химическую работу [118].

Поскольку каротиноиды, совместно экстрагируемые с хлорофиллами, также имеют интенсивные максимумы поглощения в синей области, спектрофотометрические измерения ограничены полосами поглощения в красной области. Из-за перекрытия основных полос поглощения и вторичных максимумов

в диапазоне 630–670 нм используются формулы расчетов концентрации хлорофиллов в одном экстракте, основанные на измерении оптической плотности на трех длинах волн с использованием трехволновых уравнений (называемых «трихроматическими уравнениями»). Существует три типа спектрофотометрических методов: монохроматический, дихроматический и трихроматический (таблица 3). Трихроматические методы были разработаны для определения трех типов хлорофилла ("a", "b" и "c") в отсутствие продуктов разложения [119].

Таблица 3 – Уравнения для спектрофотометрического определения хлорофилла "a"

| Метод расчета | Уравнение для расчета концентрации хлорофилла "a", $C_{\text{хл «a»}}$, мкг/л | Ссылка |
|-------------------|---|------------|
| Монохроматический | $(13.14 \cdot D_{665}) \cdot (v/V \cdot L)$ | [122] |
| Дихроматический | $26.33 \cdot ((D_{665} - D_{750}) - (D_{665} - D_{750})') \cdot (v/V \cdot L)$ | [121] |
| Дихроматический | $29.6 \cdot (D_{664} - D_{750}) \cdot (v/V \cdot L)$ | [109; 110] |
| Дихроматический | $11.9 \cdot D_{663} \cdot ((D_{663}/D_{654} \cdot 0.93) - 0.33) \cdot (v/V \cdot L)$ | [123] |
| Трихроматический | $(11.6 \cdot D_{665} - 1.3 \cdot D_{645} - 0.14 \cdot D_{630}) \cdot (v/V \cdot L)$ | [124] |
| Трихроматический | $(11.85 \cdot D_{665} - 1.54 \cdot D_{645} - 0.08 \cdot D_{630}) \cdot (v/V \cdot L)$ | [120] |
| Трихроматический | $(11.85 \cdot (D_{665} - D_{750}) - 1.54 \cdot (D_{645} - D_{750}) - 0.08 \cdot (D_{630} - D_{750})) \cdot (v/V \cdot L)$ | [111] |

Примечание: *D-оптическая плотность; $(D_{665} - D_{750})'$ - с подкислением; v-объем экстракта; V-объем воды, отфильтрованной для экстракции пигмента; L-длина кюветы

Расчеты концентрации хлорофилла "a" основаны на известных удельных спектральных показателях поглощения света хлорофиллом "a" и основными компонентами, мешающими анализу. Первые трёхволновые уравнения для расчёта концентрации хлорофилла "a" с поправкой на хлорофиллы "b" и "c" опубликовали Ричард и Томпсон в 1952 году [125]. С 1975 года концентрации хлорофиллов "a", "b", "c" определяют согласно уравнению Джефри и Хамри [120]. Для учёта содержания феофитина в 1967 году была предложена модификация одноволнового метода с подкислением экстракта [121]. В дальнейшем с целью увеличения точности эти уравнения были неоднократно модифицированы. Риччи [126] разработал универсальный набор уравнений для определения хлорофилла "a", вспомогательных хлорофиллов "b", "c" и "d", при использовании 90% ацетона, 100% метанола и этанольных растворителей.

В соответствии с ГОСТ 17.1.04.02-90, допускается использовать трёхволновые уравнения, как с подкислением экстракта, так и без него. В качестве растворителя используют 90% ацетон, поскольку измеряемые пики поглощения в его растворах четко выражены. Однако из зелёных водорослей ацетон экстрагирует хлорофилл "a" не полностью, в отличие от этанола и метанола. В то же время пики поглощения хлорофиллов "a", "b", "c" и "d" в этаноле и метаноле в красной области спектра шире, меньше по величине и перекрывают друг друга [127].

Спектрофотометрический анализ может давать различные результаты в зависимости от того, какое уравнение для расчетов используется. Грубые ошибки могут быть допущены при расчете концентраций хлорофилла "a" по трехволновым уравнениям при содержании в экстрактах большого количества феопигмента "a" и хлорофилла "d". В связи с этим трихроматические уравнения следует использовать только в том случае, если экстракт не имеет значительного содержания феопигмента "a" и хлорофилла "d" [127].

При определении низких концентраций хлорофилла "a", в силу невысокой чувствительности вышеописанных спектрофотометрических методик, требуется его концентрирование из больших объемов проб воды. В таблице 4 приведены

рекомендуемые стандартизированными методиками [110, 111] объемы воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла "а" в пробе.

Таблица 4 – Объем проб воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла "а" в пробе [110, 111]

| Концентрация хлорофилла "а" в пробе, мкг/дм ³ | Объем пробы, дм ³ |
|---|------------------------------|
| 0.05 | Св. 40 |
| 0.1 | Св. 20 до 40 включ. |
| 0.5 | Св. 4 до 20 включ. |
| 5.0 | Св. 0.4 до 4 включ. |
| 50.0 | Св. 0.2 до 0.4 включ. |
| 100.0 | Св. 0.02 до 0.2 включ. |

Для определения концентрации хлорофилла предлагается также использовать жидкостную хроматографию и флуоресцентный анализ [128 - 130]. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии более эффективен для анализа фитопланктона и анализа пигментов в пробах морской воды, когда требуется разделение сложных пигментных смесей. Методом ВЭЖХ можно обеспечить более точный учет фитопланктона, всех хлорофиллов, а также продукты их деградации в водной среде, которые могут быть пропущены при микроскопическом подсчете. Флуоресцентный анализ основан на использовании явления флуоресценции, поскольку молекулы хлорофилла "а", входящие в состав живой клетки микроводорослей, флуоресцируют на характерной длине волны света в диапазоне 680–690 нм. Достоинства флуориметрического метода становятся решающим доводом в пользу его использования в различных исследованиях, поскольку он позволяет изучать содержание органических веществ в морской воде, без какой-либо предварительной подготовки. Флуориметрический метод является одним из самых чувствительных методов, он

позволяет регистрировать незначительные концентрации веществ, недоступные для определения спектральными и химико-биологическими методами. Для определения содержания пигментов используют погружные или проточные спектрофлуориметры, флуориметры. Экспрессность измерений флуоресценции погружными флуориметрами работающими как в режиме зонда, так и в режиме буксировки дает возможность существенно повысить производительность определений органических веществ в природной воде. Флуориметры с несколькими источниками возбуждения флуоресценции обычно используются для определения таксономических групп фитопланктона [131 - 133]. Для калибровки показаний флуориметров используют результаты спектрофотометрического метода определения концентрации хлорофилла "а", таким образом обеспечивая калибровку и сравнение двух методов [134].

Определение хлорофилла "а" с использованием датчиков дистанционного зондирования на основе мощных светодиодов, позволяет в короткие сроки получать данные о концентрации основного пигмента, применение волоконных датчиков позволяет эффективно реализовать метод лазерно-индуцированной флуоресценции для определения концентрации хлорофилла "а", фитопланктона в естественной среде его обитания [135 - 137]. Для расширения возможностей мониторинга внутренних и прибрежных вод изобретают новые, доступные по цене, чувствительные, мобильные приборы, которые работают полуавтоматически в полевых условиях. Anna Friedrichs и Julia Anke Busch [138] представили устройство-прототип для измерения флуоресценции хлорофилла смартфоном SmartFluo. Лабораторные эксперименты SmartFluo показывают линейную корреляцию с концентрациями хлорофилла, измеренными на высокопроизводительном настольном лабораторном флуориметре.

Для оценки хлорофилла "а" на больших площадях океанов и морей выбирают подход, основанный на использовании спектральных характеристик излучения в синем и красном диапазонах спектра. В настоящее время на околоземной орбите работают различные дистанционные приборы, которые

передают данные о спектральном составе восходящего излучения. Из полученных данных вычисляются биооптические характеристики верхнего слоя воды, например, концентрации хлорофилла "а". Данные, полученные дистанционным зондированием Земли, например, по спутниковым данным SeaWiFS, коррелируют с наземными измерениями концентрации хлорофилла "а" [139 - 142]. Однако не все спутники могут действовать при измерениях в прибрежных акваториях, наиболее важных с точки зрения их использования в хозяйственной деятельности, в реках и озерах, не говоря уже о водоемах более мелких или скрытых элементами ландшафта, так же спутниковые системы не позволяют проводить измерения в толще воды [143]. Немаловажным фактором является процедура атмосферной коррекции, при получении и обработке результатов дистанционного зондирования Земли. В большинстве случаев процесс коррекции больших объемов данных полностью автоматизирован, используемые для коррекции алгоритмы рассчитываются исходя из усредненных показателей, и не учитывают особенностей получения каждого конкретного снимка. Часто встречающаяся проблема при использовании космических снимков - облачность. В связи с этим космические изображения суши, на которых значительную часть занимает облачность, порой не подлежат дальнейшему использованию [144].

Состояние питательных веществ в водах так же контролирует концентрацию пигментов и состав таксономических групп фитопланктона. Максимальный квантовый выход фотосинтеза зависит от концентрации питательных веществ, в связи с тем, что фотохимическая активность реакционных центров фотосистемы подавляется ограниченностью питательных веществ [145].

Трудность в изучении микроводорослей лазерными методами заключается в том, что их концентрация в воде может быть очень мала, что требует высокой чувствительности измерительного оборудования, а при лазерных измерениях в прибрежных водах необходимо учитывать влияние примесей и растворенных в воде органических веществ. Чтобы повысить чувствительность, при измерении флуоресценции стараются расположить оптическое оборудование (лазеры и спектрометры) как можно ближе к среде, в которой проводятся исследования, что

при работе в агрессивной морской среде приводит к значительному увеличению массы и габаритов оборудования и ухудшение их эксплуатационных характеристик.

Определение концентрации хлорофилла "a" в воде спектрофотометрическим, флуорометрическим и ВЭЖХ методами не выявили больших различий в абсолютных значениях, за исключением проб, когда феопигменты составляли более 50 % от общего количества фитопигментов [146].

Методы, описанные выше, подразумевают альтернативные, дополняющие друг друга, и порой разнящиеся подходы оценки хлорофилла "a". Разработка гибридных подходов, таких как комбинированное поглощение-рассеивание и флуоресцентно-рассеивающие подходы, может оптимизировать рабочие характеристики в более широких диапазонах концентрации основного пигмента. Оптимальная модель для извлечения и определения хлорофилла "a" для водоемов различной трофности еще не разработана [147 - 151].

1.7 Выводы к аналитическому обзору и постановка задач исследования

Основными проблемами оценки нефтяного загрязнения являются сложность, неопределенность и постоянная изменчивость состава нефти и нефтепродуктов при поступлении их в воду и присутствие в природных водах биогенных углеводов, продуцируемых водными организмами.

Сложность и изменение состава отдельных нефтяных компонентов, обладающих существенно различающимися свойствами, которые положены в основу их количественного определения, обуславливают значительный разброс одновременно получаемых данных по уровню нефтяного загрязнения исследуемого водного объекта. Поэтому для более адекватной оценки загрязнения углеводородами необходимо регистрировать несколько оптических характеристик, которыми обладают углеводороды различных классов.

Все существующие методики определения нефти и нефтепродуктов в воде регистрируют суммарное содержание углеводородной фракции независимо от

происхождения. Для корректной оценки нефтяного загрязнения водных объектов необходимым условием является учет биогенных УВ. В этой связи создание метода определения концентраций биогенных УВ в водных объектах является актуальной задачей. Поскольку основными продуцентами биогенных УВ являются планктонные организмы, зная биомассу фитопланктона, вычисленную по концентрации хлорофилла "а", можно рассчитать долю биогенных УВ в общей массе УВ, обнаруженных в исследуемых пробах.

Целью диссертационной работы является оценка загрязнения водной экосистемы Азовского моря углеводородами различного происхождения с учетом трансформации состава нефти и нефтепродуктов, а также наличия биогенного (природного) углеводородного фона.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- анализ методических особенностей определения углеводородов в воде;
- изучение генезиса углеводородов в водных объектах Азовского моря;
- изучение качественного и количественного состава углеводородов в липидных фракциях фитопланктона;
- обоснование и разработка методики определения хлорофилла "а" в воде пресных и морских объектов для расчета биомассы фитопланктона;
- оценка загрязненности углеводородами водной экосистемы Азовского моря и их дифференциация.

2. Экспериментальная часть и обсуждение результатов

2.1 Материалы, реактивы и используемое оборудование

В качестве **объектов исследования** использованы пробы воды, отобранные в акватории Азовского моря в различные сезоны 2015-2018 гг. и Курчанском лимане в весенний и осенний периоды 2017-2018 гг. Пробы воды отбирали с поверхностного (0,5 м) и придонного горизонтов батометром Молчанова ГР-18 в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05-85 и ГОСТ 31861-2012. В отобранных пробах проведен анализ общего содержания углеводов, парафиновых углеводов и хлорофилла "а". Количество обработанных проб воды Азовского моря составило 256, в Курчанском лимане – 21 проба.

Для определения состава углеводов в липидных фракциях фитопланктона, в качестве исходного материала были проанализированы динофитовые, диатомовые, зеленые и сине-зеленые водоросли – *Prorocentrum cordatum* (Ostenf.) Dodge, *Chaetoceros curvisetus* Cleve и *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis viridis* и *Spirulina platensis*.

При проведении исследований использовано **основное и вспомогательное оборудование**:

- газовый хроматограф «Кристалл 2000М» с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной хроматографической колонкой размером 30 м x 0.25 мм (фаза NB 1701), ООО «Хроматэк», Россия;
- спектрофотометр IR-Prestige-21, Shimadzu, Япония;
- спектрофлуориметр RF-5301, Shimadzu, Япония;
- спектрофотометр UV-2450, Shimadzu, Япония;
- весы аналитические Ohaus PA 214, 55924-13;
- дозаторы с варьируемым объемом дозирования 0.5–5 мл, «Biohit», Sartorius, США;
- колба мерная 2 класса точности исполнения 4 по ГОСТ 1770-74 вместимостью 100 см³;

- микрошприц 500 мкл, «Hamilton», США;
- микрошприц 250 мкл, «Hamilton», США;
- микрошприц 10 мкл, «Хроматэк», Россия;
- пробирки градуированные исполнения 2 с притертыми стеклянными пробками по ГОСТ 1770-74 вместимостью 10 см³ с ценой деления 0,1 см³;
- пробирки градуированные исполнения 2 с притертыми стеклянными пробками по ГОСТ 1770-74 вместимостью 25 см³ с ценой деления 0,2 см³;
- пипетки вместимостью 5 см³ по ГОСТ 29227-91 с ценой деления 0,05 см³;
- воронки делительные ВД исполнения 3, ХС, по ГОСТ 25336-82 вместимостью: 100 см³, 250 см³, 500 см³, 1000 см³;
- воронки лабораторные по ГОСТ 25336-82 диаметром 25-36 мм;
- механический встряхиватель лабораторный типа АВУ-6с;
- шкаф сушильный общелабораторного назначения.
- установка из стекла для перегонки растворителей (круглодонная колба типа К-1 с взаимозаменяемым конусом 29/32, ТС, вместимостью 1 дм³, елочный дефлегматор длиной не менее 350 мм со взаимозаменяемыми конусами 19/26 и 29/32, насадка Н1 с взаимозаменяемыми конусами 19/26-14/23, холодильник типа ХПТ-1 длиной не менее 30 см с взаимозаменяемыми конусами 14/23, аллонж АИ - 14/23) по ГОСТ 25336-82, термометр лабораторный по ГОСТ 29224-91 с диапазоном измерения температур от 0 °С до 100 °С и ценой деления не более 0,5 °С;
- дистиллятор Д-1, МРТУ-42;
- посуда из темного стекла с притертыми или корковыми, или пластиковыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и двойным слоем тефлоновой пленки для отбора проб воды вместимостью 100 см³, 250 см³, 500 см³, 1000 см³;
- кристаллизатор с притертой крышкой, диаметром 200 мм;
- стеклянные пластинки 9x12 см;
- стеклянные капилляры для нанесения проб на сорбент;
- батометр Молчанова;

- фильтры мембранные с размером пор 0.7 мкм, Whatman, GF/F;
- центрифуга лабораторная ОПн-8;
- насос вакуумный НИРА НВМ-5 УХЛ 4.2 НТ2.960.017 ТУ, Р=50 мм рт.ст;
- поликарбонатная система для вакуумной фильтрации Sartorius, диаметр фильтра 47 мм;
- флаконы стеклянные с притертыми пробками для хранения растворов и экстрактов вместимостью 20 см³, 50 см³ и 100 см³.
- посуда из темного стекла с притертыми корковыми или пластиковыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и двойным слоем тефлоновой пленки для отбора проб воды вместимостью 100 см³, 250 см³, 500 см³, 1000 см³.

В работе использованы следующие **материалы и реактивы**:

- стандартный образец хлорофилла "а", SIGMA-ALDRICH «С5753-1мг», США;
- стандартный образец смеси парафиновых углеводородов в гексане с массовой концентрацией каждого компонента 1000 мкг/см³, «SUPELCO», США;
- хлороформ, х.ч, по ТУ 6-09-4263-76;
- серная кислота, концентрированная, х.ч. ГОСТ 4204-77;
- натрий серноокислый, ч., безводный по ГОСТ 4166-76;
- калий двуххромовокислый, х.ч, ГОСТ 4220-75;
- вода, дистиллированная по ГОСТ 6709-72;
- ацетон, ч.д.а., ГОСТ 2603;
- кислота соляная, х.ч., ГОСТ 3118;
- четырёххлористый углерод, х.ч., ГОСТ 20288;
- уксусная кислота ледяная, ос.ч., ГОСТ 18270;
- н-гексан, х.ч., ТУ 6-09-26-469;
- оксид алюминия, безводный, ч.д.а, ТУ 6-09-3916;
- калия бихромат, х.ч., ГОСТ 7609.

Первичную обработку данных осуществляли в программе Excel, построение карт - в программе ArcGIS.

2.2 Методические особенности определения углеводородного загрязнения водных объектов

Для сравнительной оценки углеводородного загрязнения, получаемой наиболее распространенными методами анализа, к которым относятся ИК-спектрофотометрический и люминесцентный методы, анализировали пробы воды, отобранные в различные сезоны 2016-2018 гг. при проведении мониторинга загрязнения Азовского моря.

Пробы воды объемом около 900 см³ отбирали во время стандартных рейсов по мониторингу загрязнения Азовского моря. Сразу после отбора пробы консервировали 5 см³ четыреххлористого углерода, энергично встряхивали и помещали в прохладное место.

Дальнейшая обработка проб проводилась в стационарной лаборатории. К законсервированным пробам добавляли 25 см³ четыреххлористого углерода и экстрагировали на механическом встряхивателе в течение 15 мин. Содержимое склянки переносили в делительную воронку и после расслоения фаз, экстракт сливали в колбу объемом 50 см³, обезвоживали сульфатом натрия, переносили в стаканчик на 50 см³ и концентрировали почти досуха при комнатной температуре под током воздуха от вентилятора.

Сконцентрированный экстракт с помощью капилляра количественно переносили на пластинку размером 9 x 12 см с тонким слоем оксида алюминия III степени активности. Оксид алюминия III степени активности с размером частиц 100-250 мкм очищали от органических примесей путем прокаливания при 850 °С в течение 4 часов. После прокаливания к сорбенту добавляли 6 % воды. Дезактивация увеличивает линейную емкость сорбента и позволяет уменьшить процессы хемосорбции аналита на реакционноспособных центрах. Активность оксида алюминия определяли по шкале Брокмана [7]. Следует отметить, что прокаливание является более эффективным способом очистки, чем промывание органическими растворителями, которые, как правило, содержат органические примеси.

Пластинки для тонкослойной хроматографии с незакрепленным слоем сорбента готовили следующим образом: на чисто вымытую стеклянную пластинку насыпали оксид алюминия (около 10 г) и с помощью валика из оргстекла диаметром 15 мм, длиной 140 мм с 6-ю углублениями шириной 10 мм и толщиной 1 мм счищали избыток сорбента. На пластинке остается 6 полосок оксида алюминия шириной 10 мм и толщиной 1 мм.

На предварительно подготовленную хроматографическую пластинку с незакрепленным слоем оксида алюминия, с помощью капилляров количественно переносили полученные экстракты. При этом стенки посуды, в которой концентрировали экстракт, ополаскивали несколько раз малыми порциями четыреххлористого углерода.

Хроматографическую пластинку с нанесенными пробами помещали под углом 20° в стеклянную хроматографическую камеру (кристаллизатор с притертой крышкой), насыщенную парами подвижного растворителя. Толщина слоя подвижного растворителя (гексан: четыреххлористый углерод: уксусная кислота - 70:30:2) – 0.5 см. Нанесенные на сорбент пробы были выше слоя растворителя. Через 3 мин, когда фронт растворителя достигнет верхнего края, пластинку выдерживали в вытяжном шкафу в течение 10-15 мин для испарения растворителя.

Пластинку помещали под ультрафиолетовый осветитель ($\lambda = 254$ нм) и скальпелем отмечали границы хроматографических зон, люминесцирующих голубым (углеводороды), желтым (смолы) и коричневым (асфальтены) цветами. Слой оксида алюминия с зоной углеводородов ($R_f = 0.7-0.9$) счищали в воронку с фильтром и элюировали 5 см^3 четыреххлористого углерода порциями по 1 см^3 . Слой оксида алюминия с зонами смол и асфальтенов счищали в воронку с фильтром и элюировали 5 см^3 хлороформа порциями по 1 см^3 .

На рисунке 2 показана хроматограмма экстракта проб воды Азовского моря, отобранных летом 2016 г.

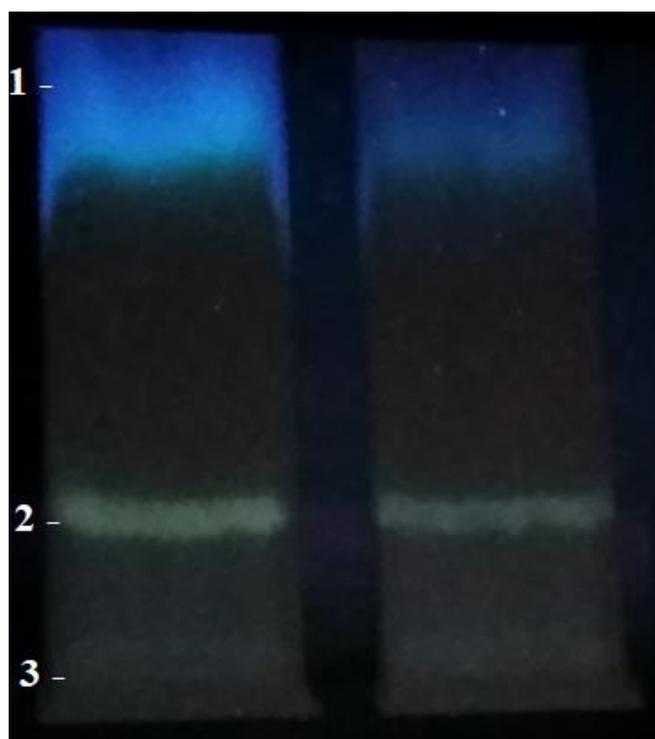


Рисунок 2 – Вид хроматограммы нефтяных компонентов, выделенных из воды Азовского моря, под УФ-светом ($\lambda_{\text{возб}} = 366$ нм): 1 – зона углеводородов; 2 – зона смол; 3 – зона асфальтенов

Количество выделенных УВ определяли по интенсивности люминесценции элюатов при $\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{люм}} = 460$ нм и по сумме интенсивностей полос поглощения при 2926 и 2956 см^{-1} в ИК-области спектра, соответственно, на спектрофлуориметре RF-5301PC фирмы Shimadzu (Япония) и ИК-спектрофотометре IR-270 фирмы Hitachi (Япония).

В отличие от углеводородной фракции в хроматографическую зону смол и асфальтенов попадают соэкстрагируемые вещества не нефтяного происхождения, значительно затрудняющие количественное определение смол и асфальтенов. В хроматографическую зону ($R_f = 0-0.4$) могут попадать производные фенолов, животные и растительные жиры, пестициды, СПАВ, красители, пигменты (хлорофилл, каротиноиды) и др. Поэтому количественное определение смолистых веществ методами ИК- и УФ-спектроскопии практически невозможно, так как матричное влияние веществ, остающихся в зоне смол и асфальтенов, весьма велико. Проведенные исследования флуоресцентных характеристик смол,

асфальтенов и наиболее распространенных соэкстрагируемых веществ показали, что для определения смолистых веществ наиболее подходящим является метод флуоресцентной спектроскопии [35]. Количество смолистых веществ (смола и асфальтенов) рассчитывали по градуировочному графику, построенному по смолистым веществам, выделенным из льяльной воды.

Количество углеводородов рассчитывали по градуировочному графику, построенному по универсальной стандартной смеси, состоящей из гексадекана, изооктана, бензола и флуорантена, взятых в соотношении 37.00 : 33.00 : 29.97 : 0.03 (весовые проценты). Стандартная смесь позволяет проводить градуировку, как ИК-спектрофотометров, так и спектрофлуориметров.

Универсальная стандартная смесь по своим оптическим характеристикам в наибольшей степени соответствует коэффициенту погашения в инфракрасной области спектра и интенсивности люминесценции углеводородов льяльных и подсланевых вод, являющихся основным источником нефтяного загрязнения Азовского моря. Использование универсальной стандартной смеси и одновременное измерение вышеупомянутых оптических характеристик позволяет давать оценку степени трансформации нефтяного загрязнения.

При получении сопоставимых значений концентраций углеводородов независимо от используемого метода, можно констатировать довольно свежее загрязнение.

Существенное превышение результатов люминесцентного метода по сравнению с данными ИК-спектрофотометрического метода характеризует углеводородное загрязнение как хроническое. Такой вывод связан с более высокой стойкостью к процессам деградации полициклические ароматических УВ, от концентрации которых зависит интенсивность люминесценции полученных элюатов, по сравнению с парафино-нафтеновыми УВ, содержащими в своем составе метильные и метиленовые группы $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$, поглощающие в инфракрасной области спектра.

Значительное превышение результатов ИК-спектрофотометрического метода по сравнению с данными люминесцентного метода, позволяет предположить о

присутствии в исследуемой пробе высоких концентраций фитопланктона – основного продуцента биогенных УВ. В составе биогенных УВ отсутствуют люминесцирующие УВ, но в большом количестве содержатся парафиновые УВ, обеспечивающие интенсивность поглощения в ИК-области спектра.

В таблицах 5-7 представлены результаты определения УВ одновременно ИК-спектрофотометрическим и люминесцентным методами в пробах воды Азовского моря, отобранных в различные сезоны 2016-2018 гг.

В различные сезоны 2016 г. в большинстве проанализированных проб концентрации УВ, определенные ИК-спектрофотометрическим и люминесцентным методами были сопоставимы и находились на низком уровне, не превышающем предельно-допустимую норму нефтепродуктов, установленную для воды водных объектов рыбохозяйственного значения – 0.05 мг/л (таблица 5).

Превышение ПДК ИК-спектрофотометрическим методом обнаружено в 11 из 62 проанализированных проб. При этом люминесцентным методом превышение ПДК обнаружено только в 3-х пробах. Существенное расхождение результатов зафиксировано в основном для проб, отобранных в Таганрогском заливе, где биомасса фитопланктона обычно выше, чем в собственно море. Более высокие результаты ИК-метода скорее всего связаны с присутствием углеводов фитопланктона, то есть биогенных УВ.

В 2-х пробах, отобранных в центральном и южном районах собственно моря, находящихся под влиянием судоходного пути, результаты люминесцентного метода были в 3 раза выше результатов ИК-спектрометрического метода, что может свидетельствовать о хроническом загрязнении углеводородами данных проб.

Таблица 5 – Результаты определения УВ в воде Азовского моря ИК-спектрофотометрическим и люминесцентным методами, 2016 г.

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцентный метод | инфракрасный метод | люминесцентный метод |
| Таганрогский залив | | | | |
| Восточный | 0.02 | <0.015 | 0.04 | 0.04 |
| | 0.02 | <0.015 | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> |
| | 0.02 | <0.015 | 0.06 | 0.05 |
| Центральный | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | <u>0.06</u> | <u>0.04</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.09</u> | <u>0.04</u> |
| Западный | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.03 |
| | <u>0.06</u> | <u>0.03</u> | 0.04 | 0.03 |
| | 0.03 | 0.02 | <u>0.05</u> | <u>0.02</u> |
| | <u>0.19</u> | <u>0.08</u> | <u>0.07</u> | <u>0.02</u> |
| Собственно море | | | | |
| Северный | -* | -* | 0.03 | 0.02 |
| | -* | -* | 0.03 | 0.03 |
| | 0.02 | 0.02 | 0.04 | 0.03 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.03 | 0.02 |
| Западный | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| | 0.02 | 0.02 | <u>0.07</u> | <u>0.02</u> |
| | 0.02 | 0.02 | 0.02 | <0.015 |
| Центральный | 0.02 | <0.015 | 0.02 | 0.02 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.04 | 0.03 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.04 | 0.04 |
| | 0.02 | 0.02 | 0.03 | <0.015 |
| | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.06 |
| | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 |

Продолжение таблицы 5

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод |
| Южный | 0.10 | 0.29 | 0.03 | 0.03 |
| | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| Восточный | 0.02 | 0.03 | <i>0.04</i> | <i>0.02</i> |
| | 0.02 | <0.015 | 0.02 | <0.015 |
| | <i>0.03</i> | <i><0.015</i> | 0.04 | 0.03 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.02 | 0.02 |
| | 0.04 | 0.03 | 0.02 | <0.015 |
| | <i>0.08</i> | <i>0.03</i> | 0.04 | 0.03 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.04 | 0.03 |

Примечание: * - пробы не отбирались;

<0.015 – курсивным шрифтом отмечены пробы, в которых результаты ИК-метода были выше;

0.02 – жирным шрифтом отмечены пробы, в которых результаты люминесцентного метода были значительно выше.

В летний период 2017 г. практически во всех проанализированных пробах концентрации УВ, определенные ИК-спектрометрическим методом, были существенно выше результатов, полученных люминесцентным методом (таблица б). В осенний период количество таких проб уменьшилось, что может свидетельствовать о снижении количества биогенных УВ, связанного с уменьшением биомассы фитопланктона, особенно в Таганрогском заливе. В южном и восточном районах собственно моря количество биогенных УВ осенью было таким же высоким, как и летом.

По данным ИК-спектрометрического метода превышение ПДК нефтепродуктов обнаружено летом в 19 из 32 проанализированных проб, осенью – в 7 из 32 проб. При этом превышение достигало 6 ПДК.

В 2-х пробах – в восточном районе Таганрогского залива осенью и центральном районе собственно моря летом зафиксирован хронический характер загрязнения.

Таблица 6 – Результаты определения УВ в воде Азовского моря ИК-спектрофотометрическим и люминесцентным методами, 2017 г.

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцентный метод | инфракрасный метод | люминесцентный метод |
| Таганрогский залив | | | | |
| Восточный | <u>0.10</u> | <u>0.03</u> | 0.04 | 0.04 |
| | <u>0.09</u> | <u>0.03</u> | 0.04 | 0.04 |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | 0.04 |
| Центральный | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | 0.03 | 0.02 |
| | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | 0.03 | 0.03 |
| Западный | <u>0.25</u> | <u><0.015</u> | 0.015 | 0.02 |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | 0.03 |
| | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | 0.03 | 0.02 |
| | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> | <u>0.04</u> | <u>0.02</u> |
| Собственно море | | | | |
| Северный | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | 0.03 |
| | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | 0.02 |
| | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | 0.05 | <0.015 |
| | 0.03 | 0.02 | 0.05 | <0.015 |
| Западный | 0.02 | <0.015 | 0.05 | <0.015 |
| | <u>0.30</u> | <u>0.12</u> | 0.05 | <0.015 |

Продолжение таблицы 6

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод |
| Западный | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | 0.05 | 0.03 |
| Центральный | 0.02 | <0.015 | 0.05 | <0.015 |
| | <u>0.12</u> | <u>0.08</u> | 0.06 | <0.015 |
| | 0.05 | 0.08 | 0.06 | <0.015 |
| | <u>0.15</u> | <u><0.015</u> | 0.11 | <0.015 |
| | 0.02 | <0.015 | 0.02 | 0.02 |
| | <u>0.09</u> | <u><0.015</u> | <u>0.08</u> | <u><0.015</u> |
| Южный | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.23</u> | <u><0.015</u> | <u>0.08</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.10</u> | <u>0.06</u> | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> |
| Восточный | <u>0.11</u> | <u><0.015</u> | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.11</u> | <u><0.015</u> | <u>0.12</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.08</u> | <u>0.06</u> | <u>0.07</u> | <u>0.04</u> |
| | <u>0.08</u> | <u>0.03</u> | <u>0.17</u> | <u>0.08</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | 0.02 |
| | <u>0.14</u> | <u>0.10</u> | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> |

В летний период 2018 г. на всей акватории Азовского моря отмечено преобладание биогенных УВ (таблица 7). В 8-ми из 31-ой проанализированной пробы воды ИК-спектрометрическим методом зафиксировано превышение ПДК в 1.2-2.8 раза. Люминесцентным методом превышение ПДК в 2.4 раза обнаружено только в одной пробе воды, отобранной летом в восточном районе Таганрогского залива. При этом результаты люминесцентного метода были в 1.5 раза выше

данных ИК-спектрометрического метода, что подтверждает хронический характер нефтяного загрязнения, отмеченный в этом же районе осенью 2017 г.

Таблица 7 – Результаты определения УВ в воде Азовского моря ИК-спектрометрическим и люминесцентным методами, 2018 г.

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцентный метод | инфракрасный метод | люминесцентный метод |
| Таганрогский залив | | | | |
| Восточный | <u>0.06</u> | <u>0.04</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | 0.08 | 0.12 | <u>0.09</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| Центральный | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | 0.06 | 0.05 |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.05</u> | <u>0.03</u> |
| Западный | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.10</u> | <u><0.015</u> | <u>0.10</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| | <u>0.11</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| Собственно море | | | | |
| Северный | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | <u>0.19</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.07</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| Западный | <u>0.08</u> | <u><0.015</u> | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | <u>0.13</u> | <u><0.015</u> |
| Центральный | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | <u>0.18</u> | <u><0.015</u> |

Продолжение таблицы 7

| Районы отбора проб воды | Лето | | Осень | |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод | инфракрасный метод | люминесцент- ный метод |
| Центральный | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.14</u> | <u><0.015</u> | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> |
| Южный | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.06</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| Восточный | <u>0.02</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.12</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.04</u> | <u><0.015</u> | <u>0.05</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.08</u> | <u><0.015</u> | 0.02 | <0.015 |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |
| | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> | <u>0.03</u> | <u><0.015</u> |

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости одновременного измерения двух оптических характеристик углеводородов, выделенных из исследуемых проб воды. Соотношения интенсивностей поглощения в инфракрасной области спектра и люминесценции углеводородов, исходя из их различной устойчивости к процессам трансформации, позволяет использовать полученные данные для оценки характеристики загрязнения.

2.3 Генезис углеводородов в водных объектах Азовского бассейна

Поскольку н-алканы являются биологическими маркерами, исследование качественного состава н-алканов позволяет получать важную информацию не только о количестве, но и о генезисе УВ в исследуемом водном объекте [152]. Для

идентификации происхождения УВ использованы данные хроматографического анализа н-алканов, полученные при анализе проб воды Азовского моря в различные сезоны 2015-2018 гг.

Пробы воды объемом 900 см^3 сразу после отбора консервировали 20 см^3 гексана. В стационарной лаборатории пробу воды переносили в делительную воронку и встряхивали 15 мин на механической мешалке. После четкого расслоения фаз, водный слой сливали в сосуд для повторной экстракции 20-ю см^3 гексана. Гексановые экстракты сливали в коническую колбу вместимостью 50 см^3 через стеклянную воронку, заполненную безводным сульфатом натрия. Объединенный экстракт концентрировали при комнатной температуре потоком воздуха от вентилятора до объема 0.1 см^3 .

Концентраты выделенных н-парафинов количественно с помощью капилляров переносили на предварительно подготовленную хроматографическую пластинку с незакрепленным слоем оксида алюминия и далее проводили анализ таким же способом, как и при определении общего содержания УВ.

Слой оксида алюминия с зоной углеводородов, имеющей $R_f = 0.90$, счищали в воронку с бумажным фильтром и элюировали 5 см^3 гексана порциями по 1 см^3 . Элюат УВ концентрировали до 100 мкл. Шприцем вместимостью 10 мкл отбирали 1 мкл подготовленной для хроматографирования пробы и вводили в испаритель хроматографа.

Индивидуальный состав н-алканов, обнаруженных в пробах воды Азовского моря, отобранных в различные сезоны 2015-2018 гг., определяли на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» с пламенно-ионизационном детектором (ПИД) и капиллярной хроматографической колонкой размером 30 м x 0.25 мм (фаза NB 1701).

Условия работы газового хроматографа:

- газ-носитель – азот;
- скорость газа-носителя – 3.0 мл/мин;
- температура инжектора – 240 °С;
- температура колонки – 130-280 °С;

- скорость подъема температуры колонки – 8 °С/мин;
- температура детектора – 300 °С.

Идентификацию УВ проводили по стандартному образцу смеси парафиновых углеводородов в гексане с массовой концентрацией каждого компонента 1000 мкг/см³ (фирма «SUPELCO», США).

Для нефтяных УВ из антропогенных источников при свежем загрязнении характерно монотонное распределение гомологов n-алканов в области C₁₄-C₃₅ (рисунок 3), при хроническом – наличие «горба» неразделенных нафтено-ароматических соединений (рисунок 4).

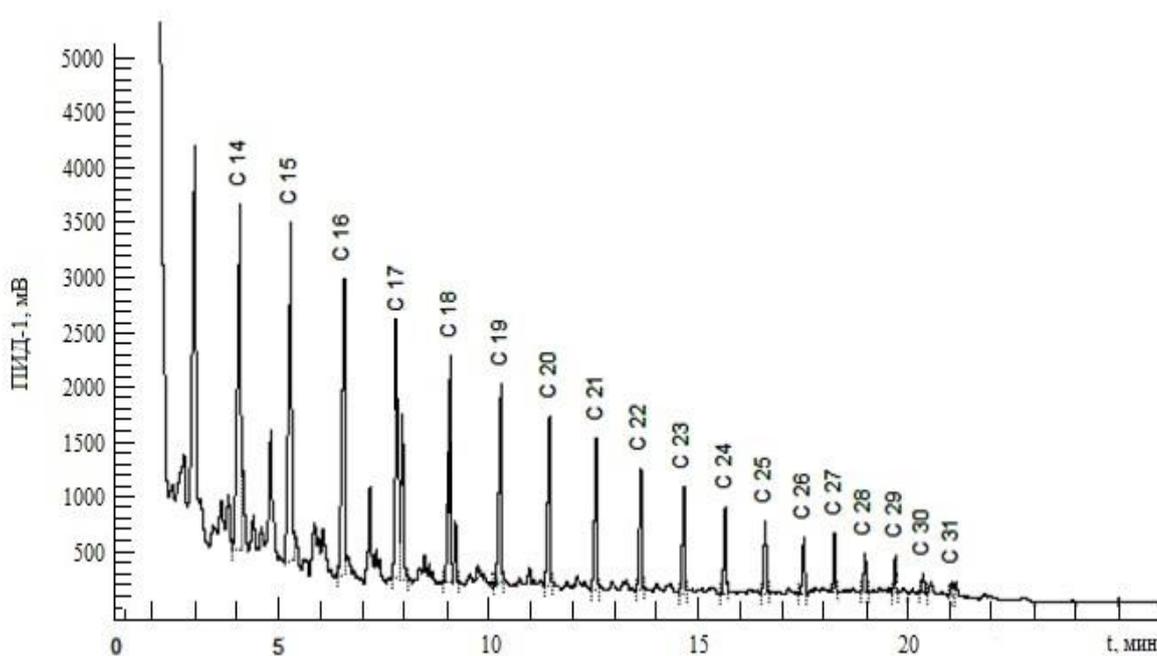


Рисунок 3 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из сырой нефти

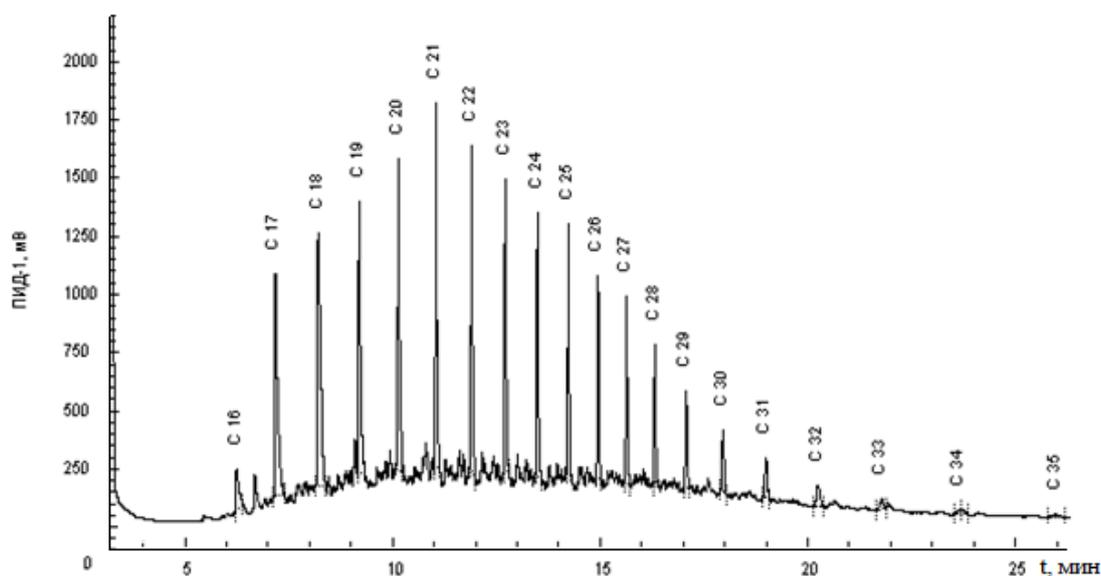


Рисунок 4 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из льяльных вод

В природных условиях в течение первых двух часов обнаружить свежие нефтяные разливы непосредственно в море очень трудно, так как пленочные нефтепродукты в природных условиях теряют компоненты, имеющие температуру кипения ниже 250°C [6]. К таким компонентам относятся парафино-нафтеновые углеводороды, содержащие до 14 атомов углерода и бициклические конденсированные и неконденсированные ароматические углеводороды. Потери компонентов за счет испарения пленки: для легких нефтей и нефтепродуктов – 75%, средних – 50% и тяжелых – 5–10% от первоначально состава. Одновременно, наряду с испарением, изменение компонентного состава происходит за счет химической и биологической трансформации нефтяных соединений.

Поэтому в проведенных исследованиях не были получены хроматограммы, типичные для первоначального состава нефтяных разливов.

В некоторых пробах воды, отобранных на различных горизонтах водной толщи Азовского моря, отмечалось присутствие уже глубоко трансформированных углеводородов, о чем свидетельствует “горб” неразделенных нафтенно-ароматических соединений (рисунки 5-8).

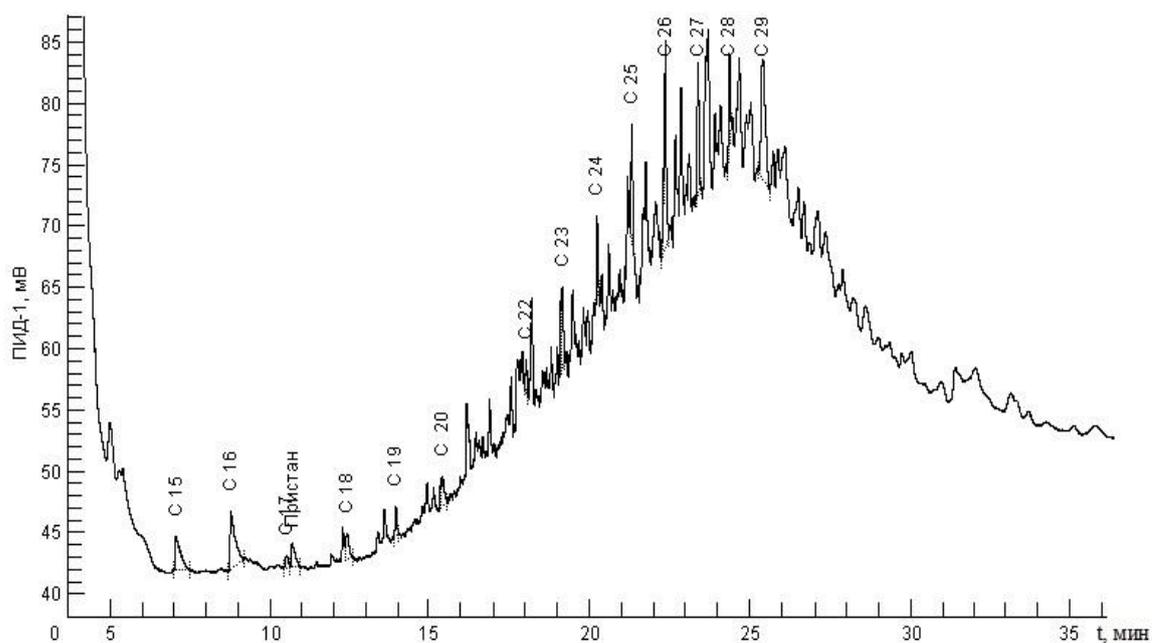


Рисунок 5 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2015 г.

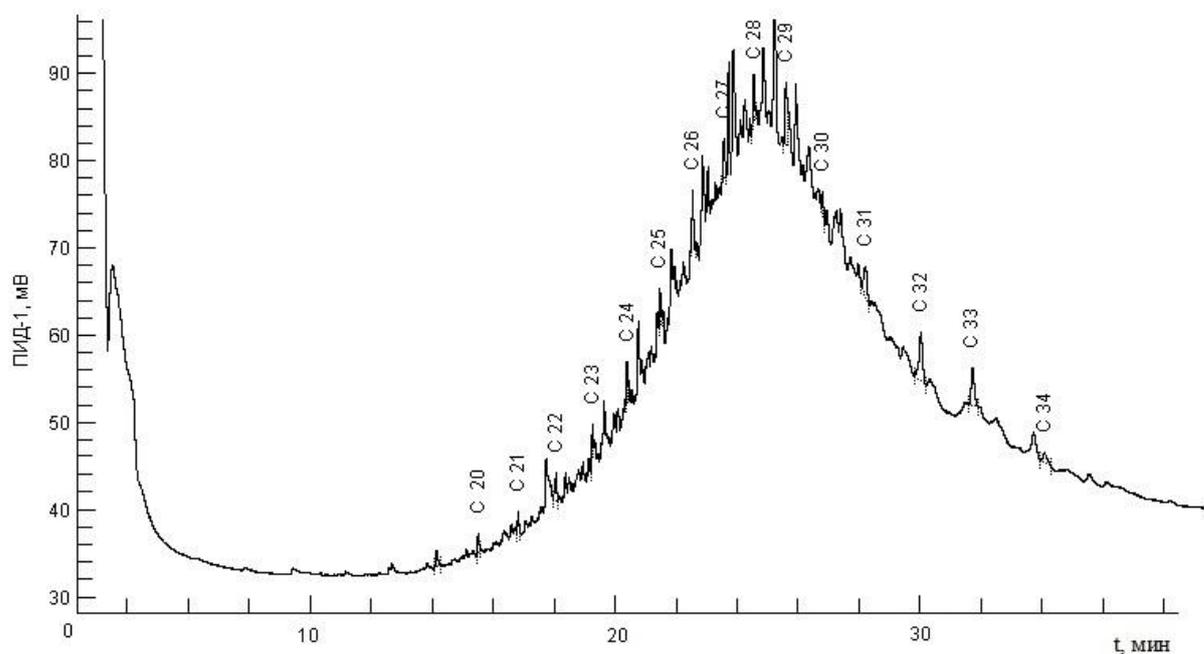


Рисунок 6 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря осенью 2016 г.

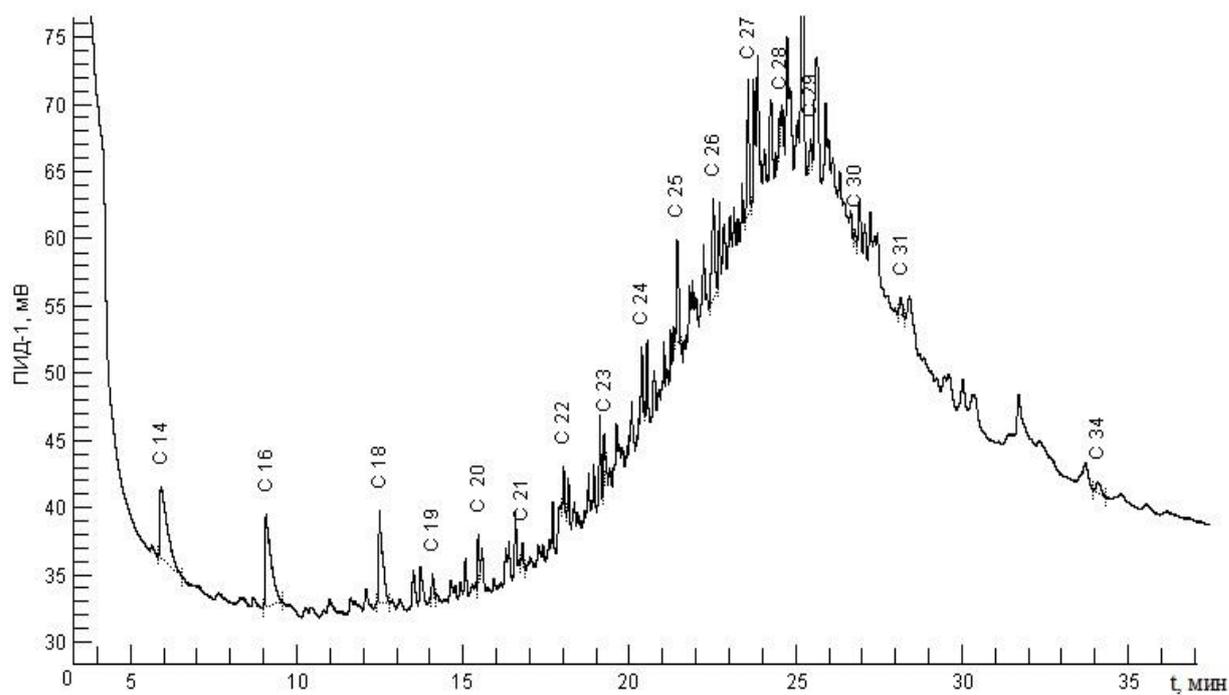


Рисунок 7 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2017 г.

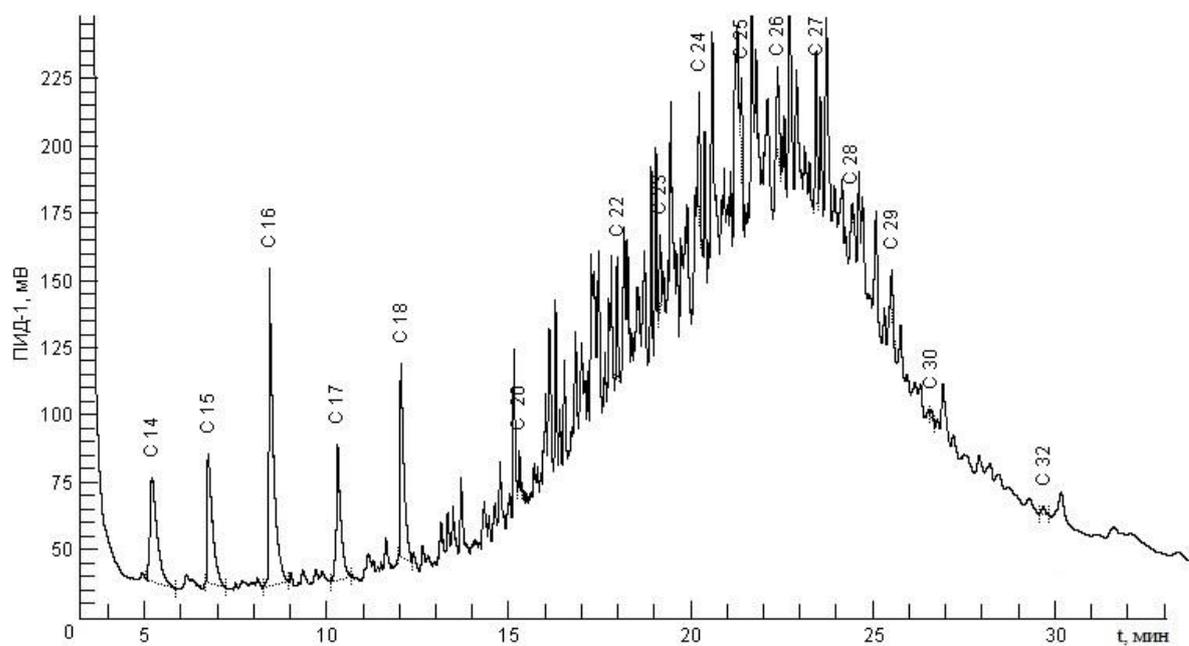


Рисунок 8 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря осенью 2018 г.

Анализ хроматограмм н-алканов, обнаруженных в исследуемых пробах воды, показал, что их условно можно разделить на 4 типа. Отличительными особенностями хроматограмм разных типов являются:

Тип I – преобладание автохтонных низкомолекулярных н-алканов C_{15} – C_{18} (рисунки 9-12). Присутствие нечетных н-алканов, особенно C_{17} , обусловлено преобладанием их в липидных фракциях фитопланктона [153]. Высокое содержание н-алканов с четным числом углеродных атомов – C_{16} и C_{18} связано с процессами бактериальной трансформации автохтонных УВ [154, 155]. В пробах воды, отобранных в летний период, концентрации четных н-алканов выше, чем нечетных, что связано с более высокой интенсивностью бактериальных процессов при высоких температурах. Во время зимней съемки отмечено преобладание нечетного фитогенного н-алкана – C_{17} , высокие концентрации которого могут быть связаны с лизингом отмерших клеток фитопланктона.

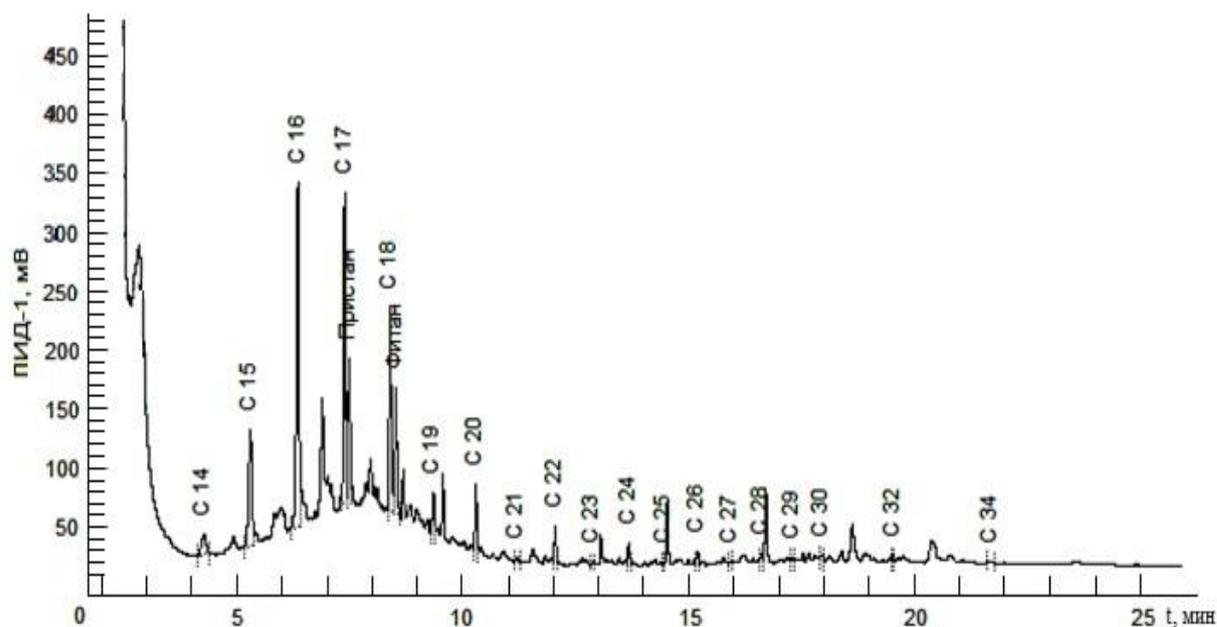


Рисунок 9 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря осенью 2015 г.

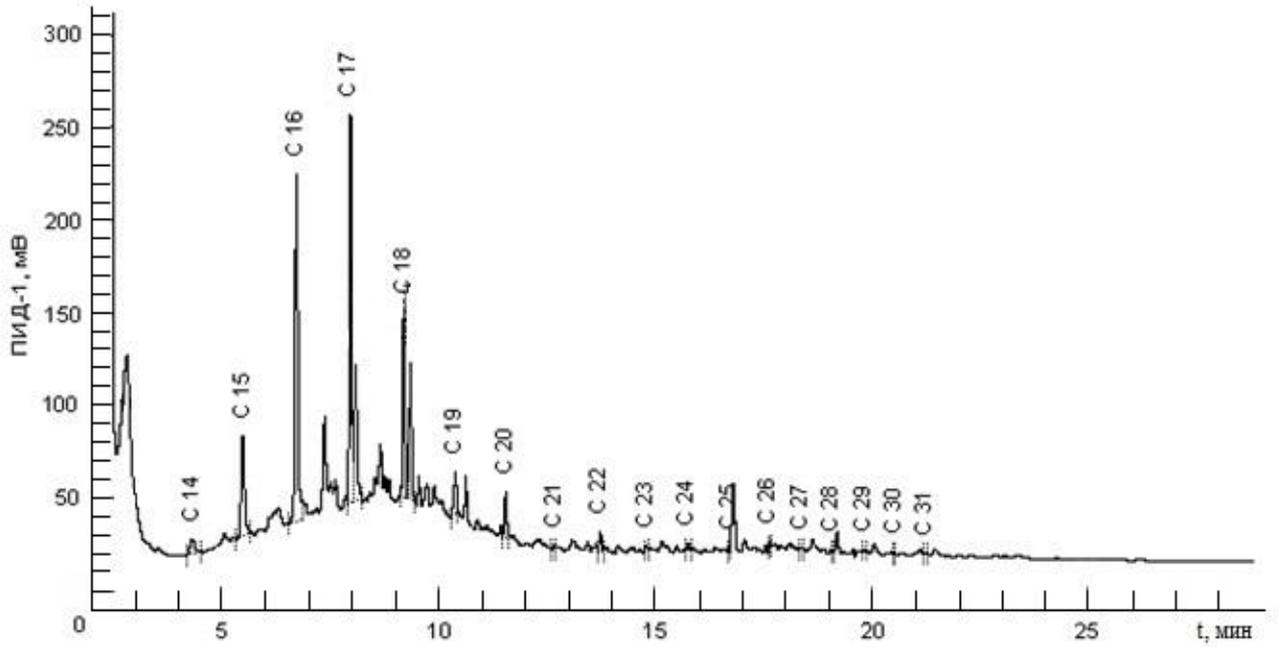


Рисунок 10 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря осенью 2016 г.

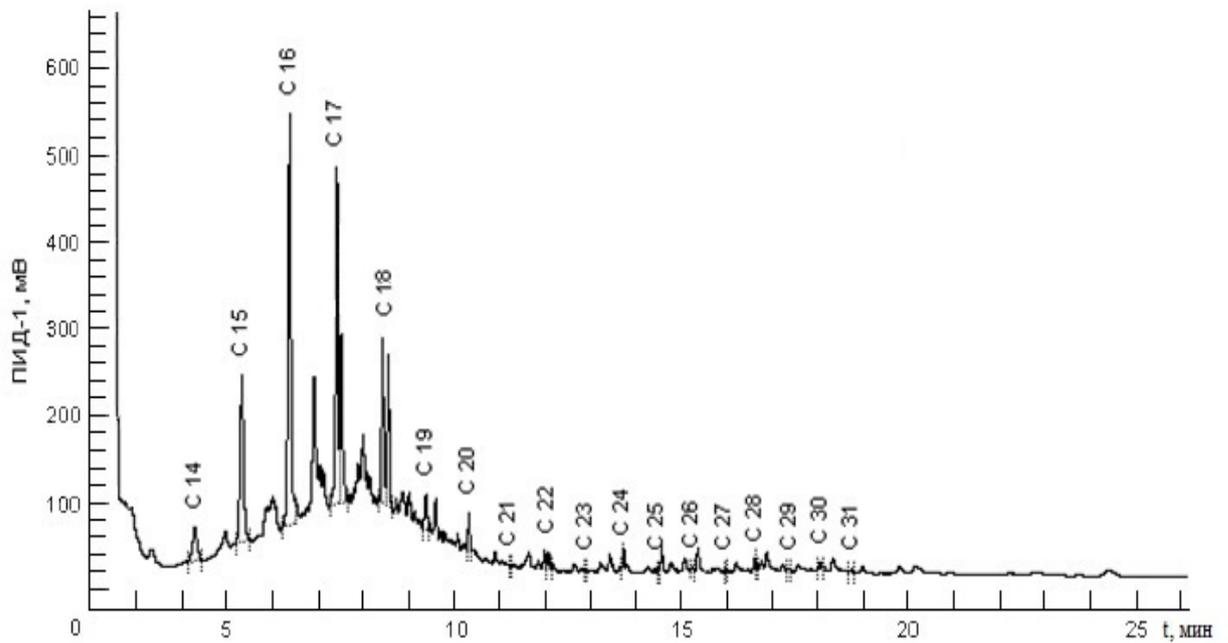


Рисунок 11 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2017 г.

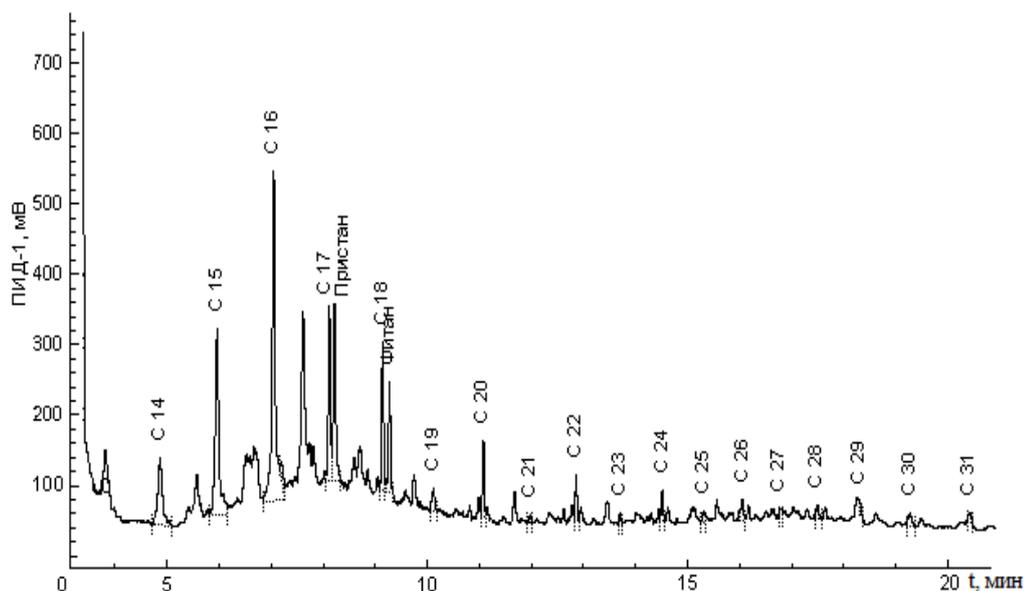


Рисунок 12 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2018 г.

Преобладание УВ с нечетным числом атомов углерода объясняется тем, что одним из основных компонентов планктонных организмов (водорослей, бактерий и т. д.), морских высших и низших организмов, наземных животных и растений являются жирные кислоты, которые имеют, в основном, четное число углеродных атомов. После гибели клеток животных и растительных организмов их вещество подвергается воздействию бактерий и окислителей. Основными процессами превращения жирных кислот в природных условиях, как установлено [9], являются реакции неполной деструкции, кетонного превращения и абиогенного декарбоксилирования. Наиболее важными являются реакции декарбоксилирования, которые приводят к образованию нормальных парафиновых углеводородов с числом атомов углерода на единицу меньше, чем в молекуле исходной кислоты [59].

Тип II – преобладание низкомолекулярных и высокомолекулярных четных *n*-алканов – C₁₆–C₂₈ (рисунки 13-16). Хроматограммы такого типа в водной толще Азовского моря фиксируются в довольно большом количестве проб, особенно в летний период. Преобладание углеводородов с четным числом углеродных

атомов нехарактерно, как для нефтяных углеводородов, так и для углеводородов, входящих в состав фитопланктона. По известным данным [154, 155] четные н-алканы могут быть продуктами бактериальной трансформации органического вещества, а отношение нечетных и четных гомологов в низкомолекулярной области $< C_{22}$ может служить индикатором интенсивности трансформации УВ микроорганизмами. В работе [156] по исследованию биотрансформации состава н-алканов в антарктических условиях отмечено преобладание высокомолекулярных четных н-алканов и высказано предположение, что это может быть связано с бактериальным синтезом четных алканов, происходящим в результате адаптационных изменений метаболизма водных организмов. Есть также предположение, что преобладание четных алканов связано с поступлением их из недр по тектоническим трещинам. Это предположение основано на том, что при генерации керогена морского происхождения в высокомолекулярном диапазоне изменяется соотношение четных и нечетных н-алканов в пользу преобладания УВ с четным числом углеродных атомов [157]. В статье H.Jr. Dembicki отмечено, что четные н-алканы преимущественно образуются в сильносоленой карбонатной среде, где аэробные и анаэробные бактерии живут на отмерших сине-зеленых водорослях [158].

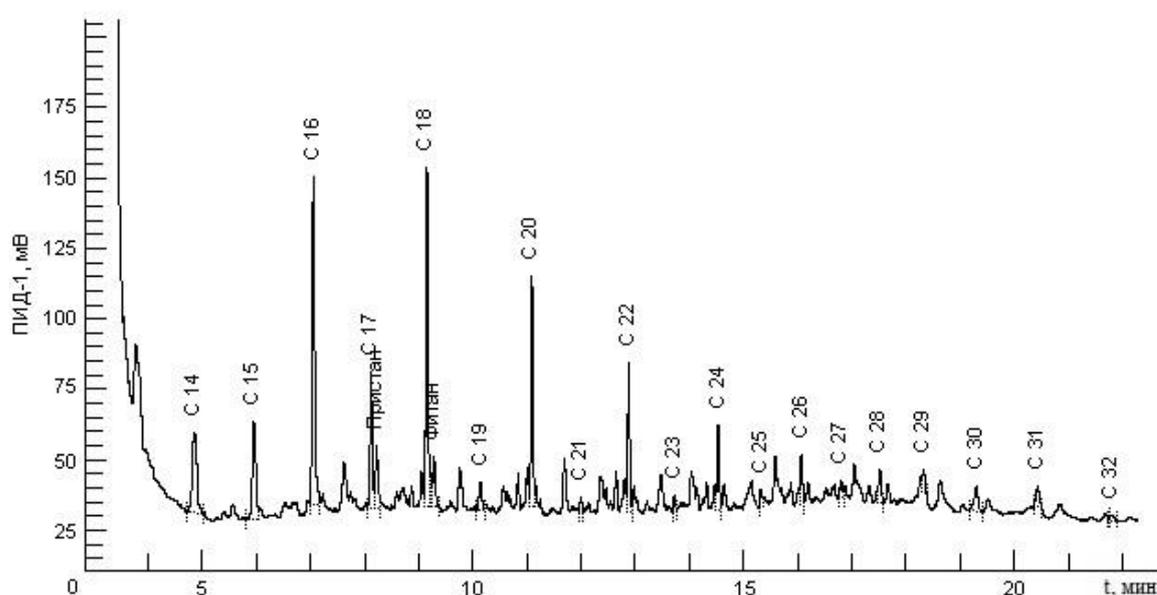


Рисунок 13 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря летом 2016 г.

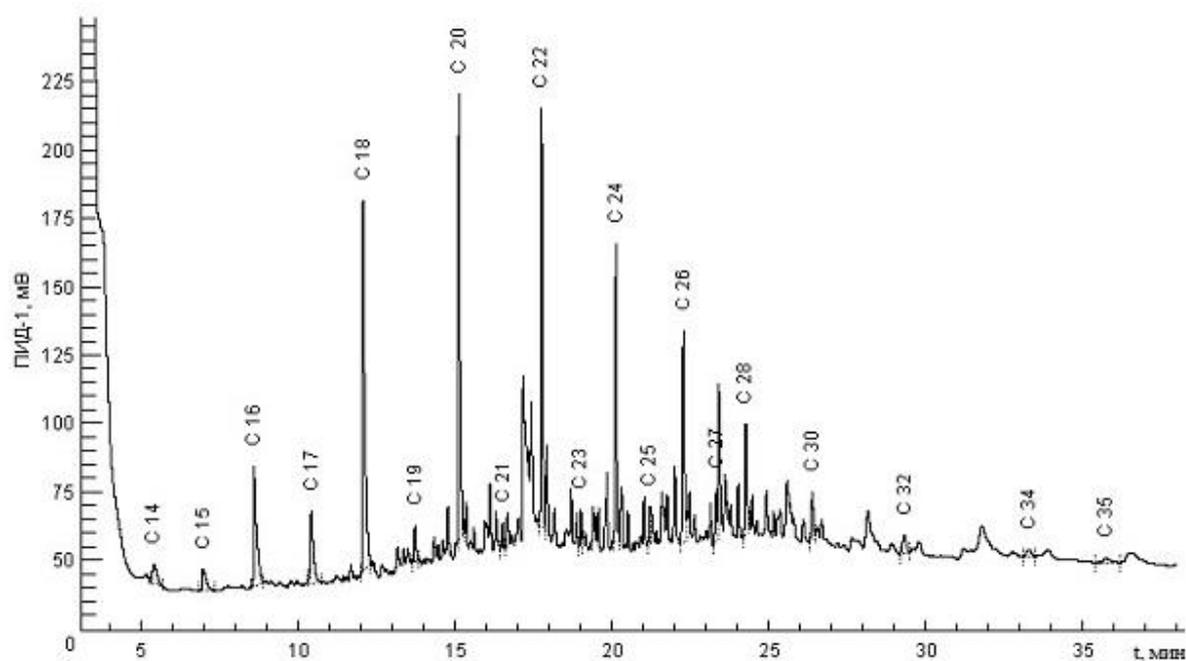


Рисунок 14 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря летом 2017 г.

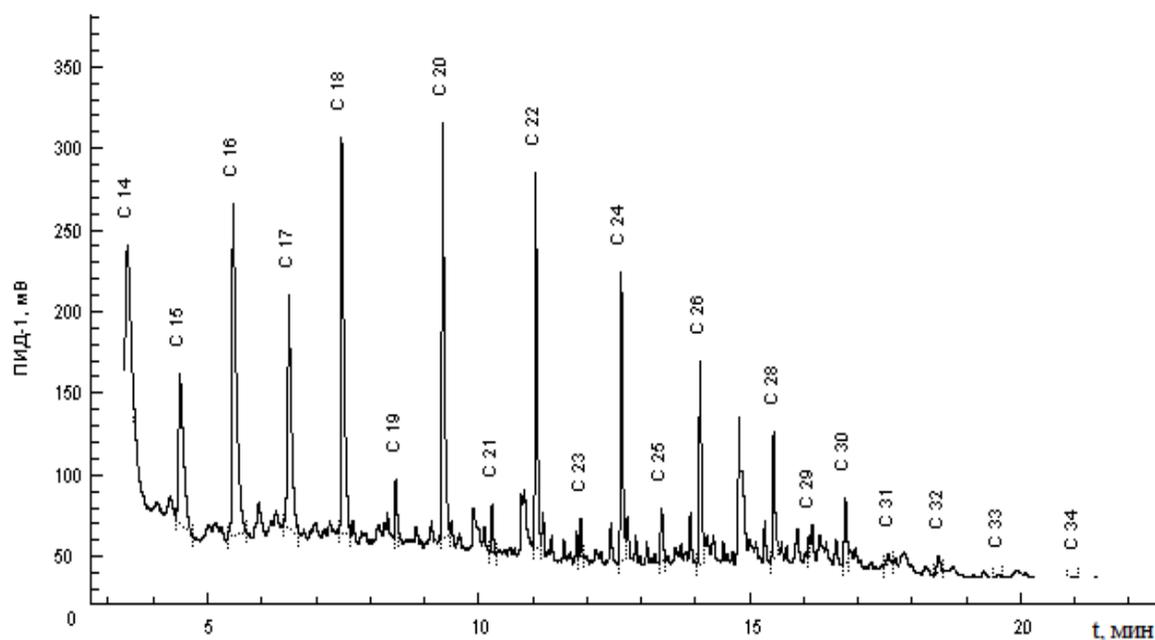


Рисунок 15 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря осенью 2018 г.

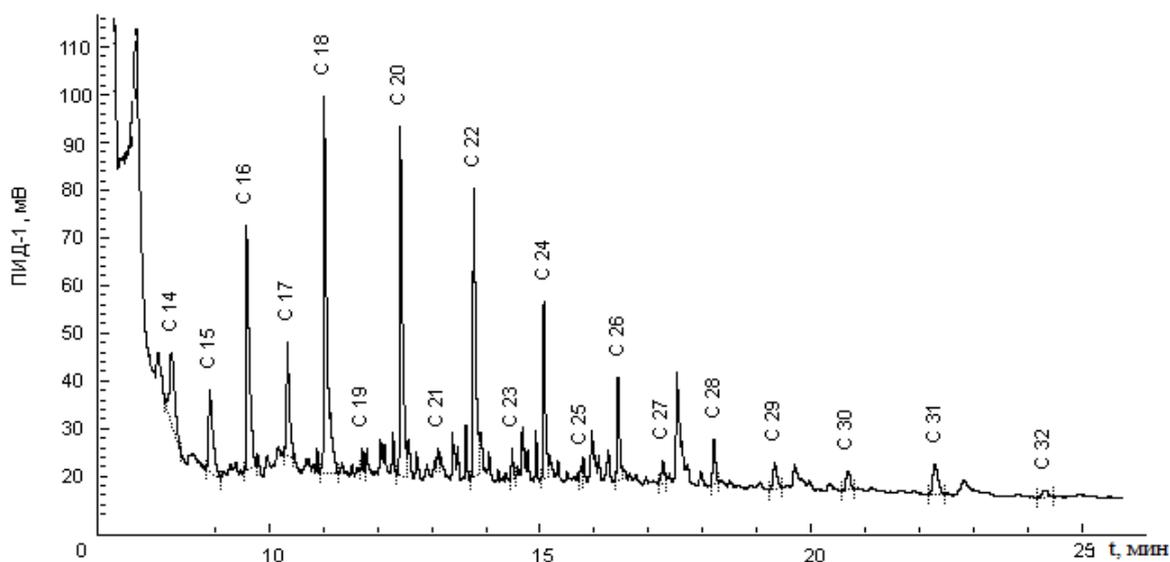


Рисунок 16 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2018 г.

Тип III – наличие гомологического ряда с максимумом $C_{23} - C_{27}$ при отсутствии легких УВ и «горба» неразделенных нафтно-ароматических соединений (рисунки 17-20). Подобный аномальный состав углеводородов также был обнаружен в донных отложениях Балтийского моря [159], в воде и донных осадках в районах нефтегазовых месторождений северо-восточной части о. Сахалин [46]. Поскольку такие составы по критериям не соответствуют ни одному из известных источников, существует предположение, что источником этих УВ, названных “петрогенными УВ”, может быть природное высачивание нефти на дне моря. Петрогенные нефтяные алканы отличаются от антропогенных практически полным отсутствием гомологов $n-C_{23}$ и нафтно-ароматического «горба».

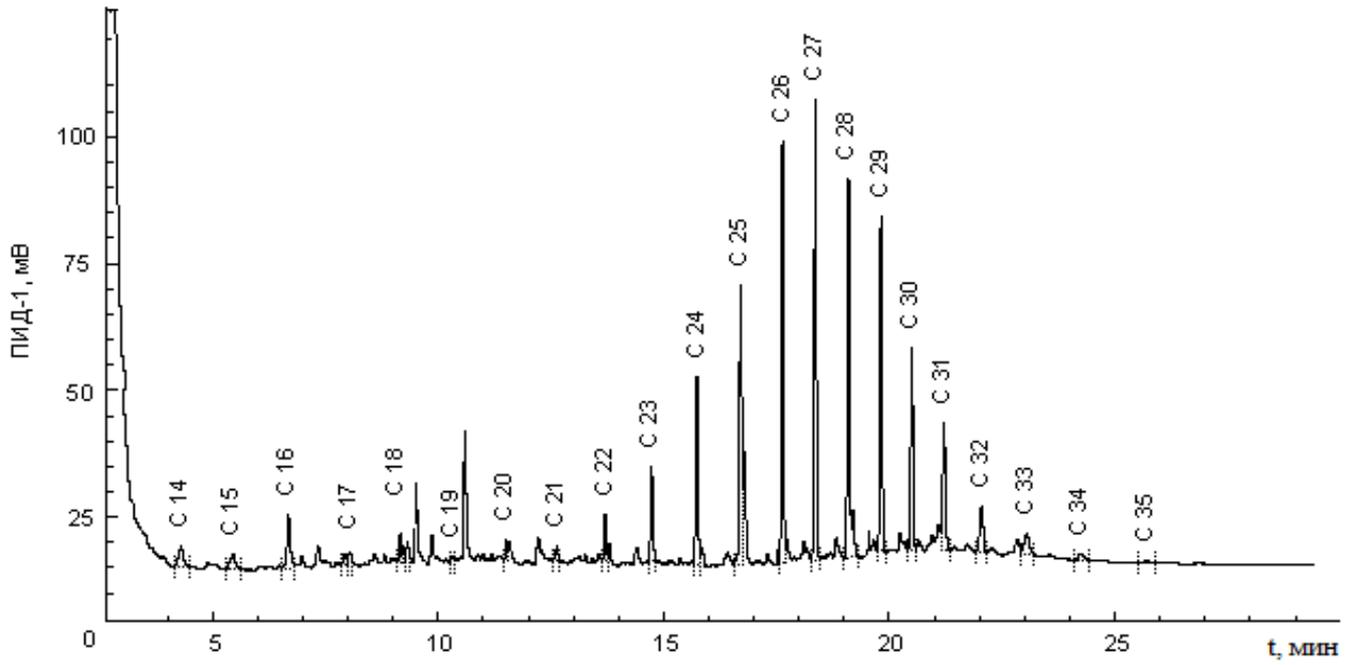


Рисунок 17 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2015 г.

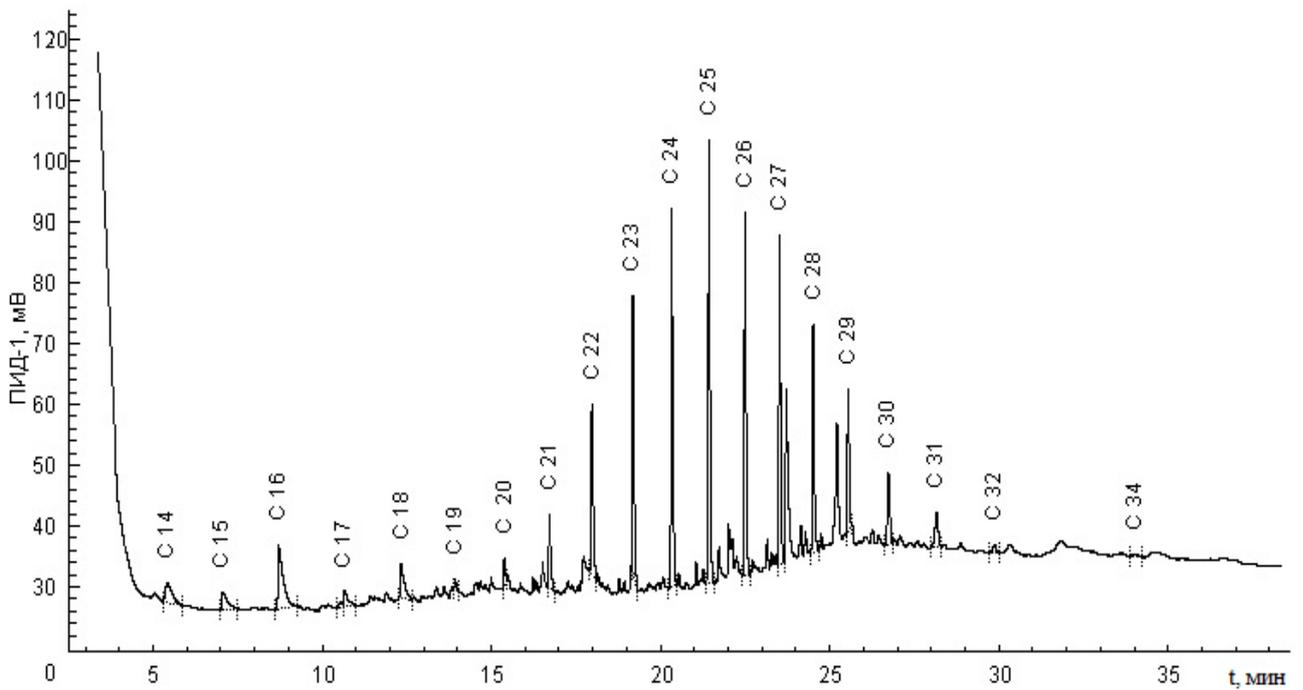


Рисунок 18 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря осенью 2016 г.

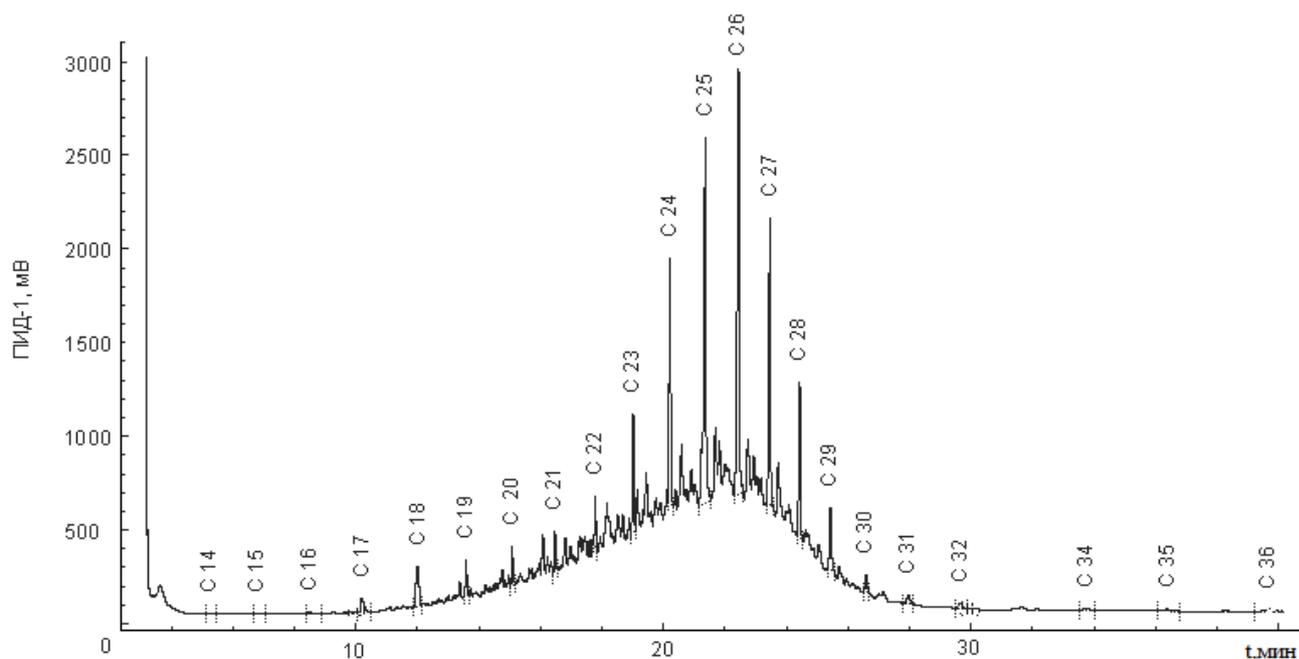


Рисунок 19 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря летом 2017 г.

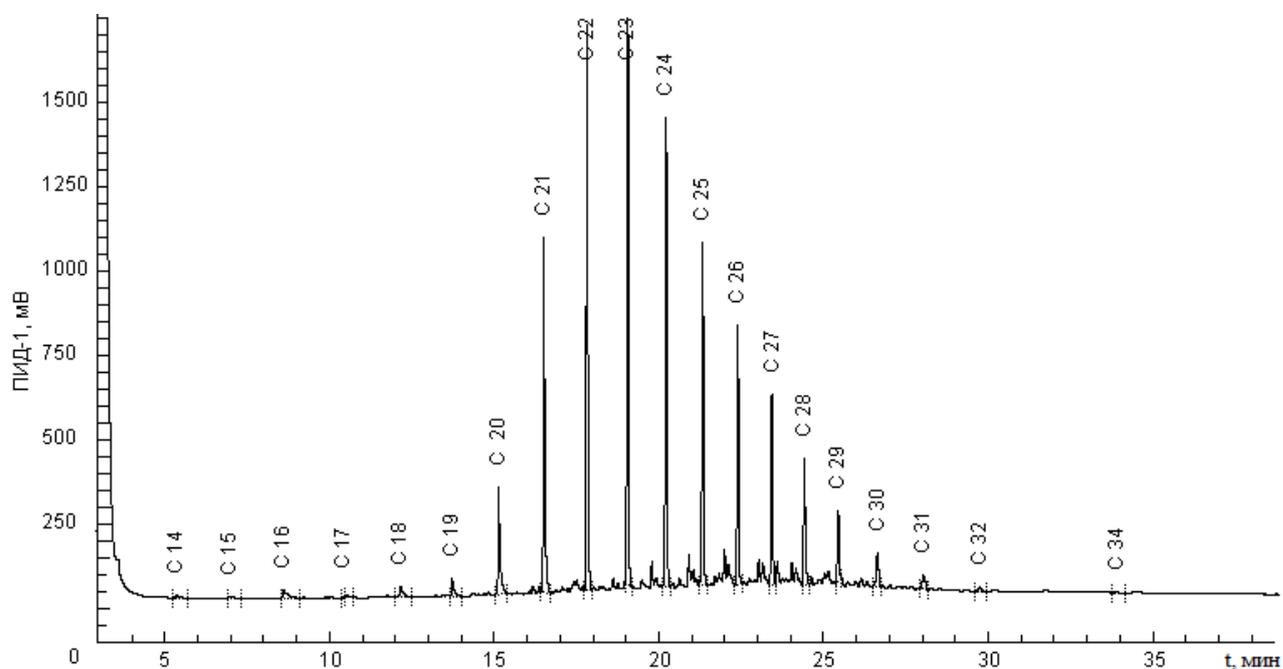


Рисунок 20 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2018 г.

Тип IV – высокое содержание н-алканов в низкомолекулярной области C_{16} – C_{18} , а в высокомолекулярной области – монотонное распределение C_{23} – C_{31} на фоне «горбов» неразделенных соединений (рисунки 21, 22). Такое распределение связано с одновременным присутствием в пробах воды в сопоставимых концентрациях планктоногенных УВ и трансформированных остатков УВ, источниками которых предположительно могут быть утечки или сливы промывочных и балластных вод из танков нефтеналивных судов, а также аварийные разливы. Следует отметить, что нефтяные УВ способствуют интенсификации биохимических процессов, в результате которых образуются автохтонные УВ вторичного происхождения, формирующие их современный биогенный фон [160].

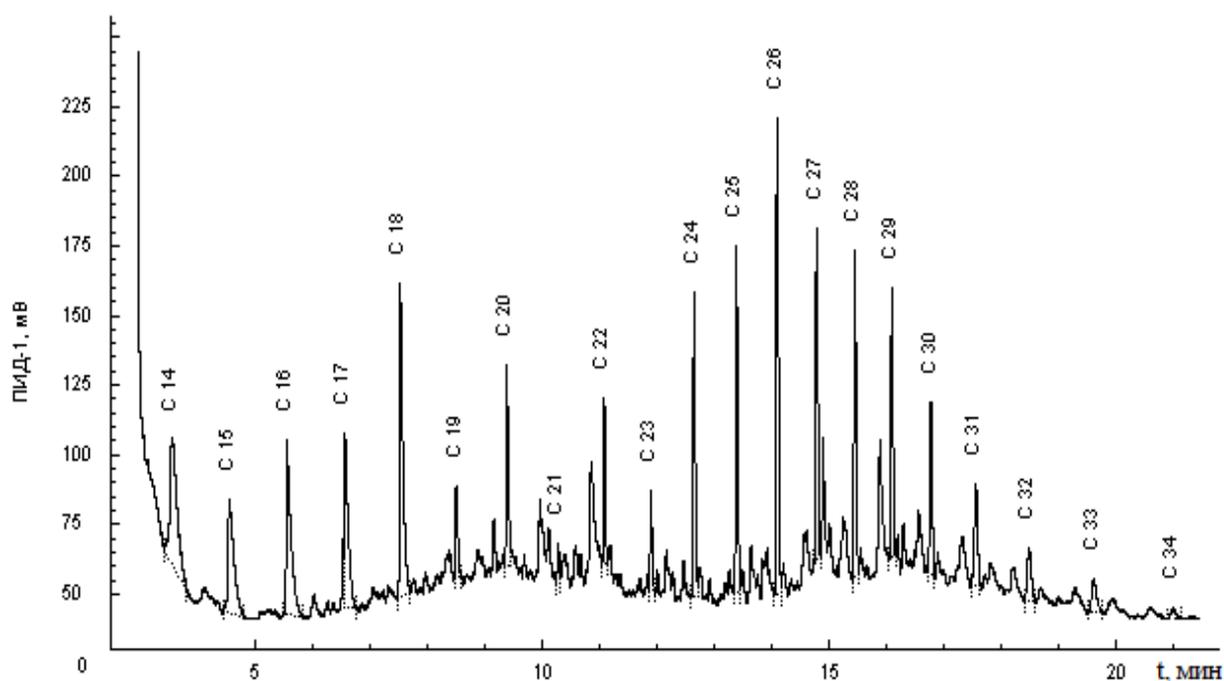


Рисунок 21 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря летом 2015 г.

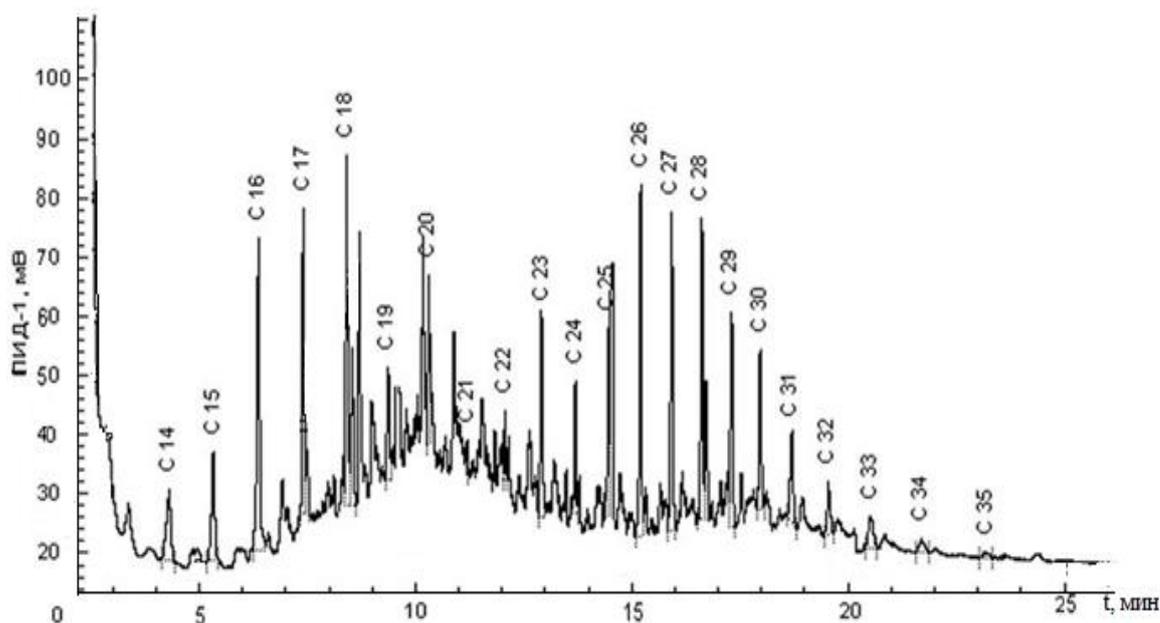


Рисунок 22 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря осенью 2018 г.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в акватории Азовского моря присутствуют не только антропогенные УВ, но и УВ, продуцированные водными организмами, что подтверждает необходимость учета биогенного (природного) углеводородного фона исследуемых водных объектов при оценке уровня нефтяного загрязнения.

2.4 Определение углеводородов в липидных фракциях культивированных видов фитопланктона

Основными продуцентами биогенных УВ являются планктонные организмы, поэтому весьма целесообразным представляется определение качественного и количественного состава УВ, в частности, в липидах фитопланктона. В эксперименте в качестве исходного материала проанализирован состав пиропитовых, диатомовых, зеленых и сине-зеленых водорослей. Образцы культур были предоставлены сотрудниками Института морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН (г. Севастополь).

Для изучения молекулярного состава биогенных УВ были получены чистые культуры массовых видов морского фитопланктона, выращенные в лабораторных условиях. После получения достаточной биомассы фитопланктона проводились эксперименты по выделению углеводов из липидных фракций.

Устойчивость фитопланктона к различным воздействиям окружающей среды в значительной степени определяется особенностями липидного обмена, это связано с тем, что липидные компоненты участвуют во всех важнейших физиолого-биохимических процессах биоты [161]. Одним из факторов, способствующих повышенному содержанию углеводов, выступают липиды. Углеводы в наибольшей степени накапливаются в жизненно важных органах с высоким содержанием липидов, таких как мозг, печень, кишечник [162].

Липиды, выделенные из биологического материала, представляют собой сложную смесь. Наиболее эффективными и широко применяемыми методами качественного и количественного анализа компонентного состава смесей липидов являются методы газожидкостной и тонкослойной хроматографии. Определение УВ в липидных фракциях фитопланктона, культивированных в лабораторных условиях, осуществляли по такой же схеме анализа, как и при определении УВ в пробах воды.

Для накопления необходимой для анализа биомассы, водоросли выращивали в стерильных колбах различного объема, наполненные искусственно созданной морской водой при определённых условиях, таких как: соблюдение стерильности (помещения, посуды, питательной среды), аэрация воздухом колб с водорослями и освещенность от 500 до 3000 люкс в зависимости от культуры. Так для *Synechococcus* sp. достаточно освещенности в 500 люкс. Температура в боксе варьировала от +16 до +20 °С, соответственно в колбах на 2-3 °С была ниже. Водородный показатель (рН) водной среды находился на уровне 8.0-8.2.

В зависимости от вида культуры пересев делали один раз в 4, 7, 20 дней. Это связано с тем, что плотностной фактор негативно влияет на водоросли, что ведет к их гибели. Посуду для посева обрабатывали концентрированной

соляной кислотой, затем стерилизовали в паровом стерилизаторе DGM-80 при 120 °С под давлением 2 атмосферы в течение 3-4 часов.

Микроводоросли культивировали на среде Конвея, которая содержит сбалансированное количество азота, фосфора и микроэлементов, что способствует быстрому увеличению биомассы. Состав питательной среды Конвея был расширен, аналогично среде Guillard F/2. В среду были включены дополнительные питательные вещества и витамины (В₁, В₆, В₁₂). Среда готовилась на стерилизованной бидистиллированной воде.

Потребность микроводорослей в микро- и макроэлементах различна, поэтому при выращивании подобрали питательную среду, на которой можно получить максимальные биомассы. Такие оптимальные условия были подобраны путем проведения ряда экспериментов и расчета концентрации клеток в культурах. Концентрацию клеток определяли прямым расчётом в камере «Горяева» под микроскопом. Вид диатомовых водорослей *Prorocentrum cordatum* (Ostenf.) Dodge в данных условиях и на модернизированной среде Конвея увеличил концентрацию клеток с 0.1025 до 0.2808 мг/дм³ в течение нескольких суток.

Извлечение УВ из липидных фракций культивированных видов фитопланктона проводили четыреххлористым углеродом с концентрированием экстракта и выделением углеводов в тонком слое оксида алюминия III степени активности в системе растворителей гексан-четырёххлористый углерод-уксусная кислота (70:30:2).

На рисунке 23 представлена хроматограмма экстракта сине-зеленых водорослей. Зона, имеющая $R_f = 0-0.4$, люминесцирует красным цветом, поскольку содержит хлорофилл. Зона УВ, имеющая $R_f = 0.7-0.9$, не светится, что подтверждает отсутствие полициклических ароматических УВ в фитопланктоне.

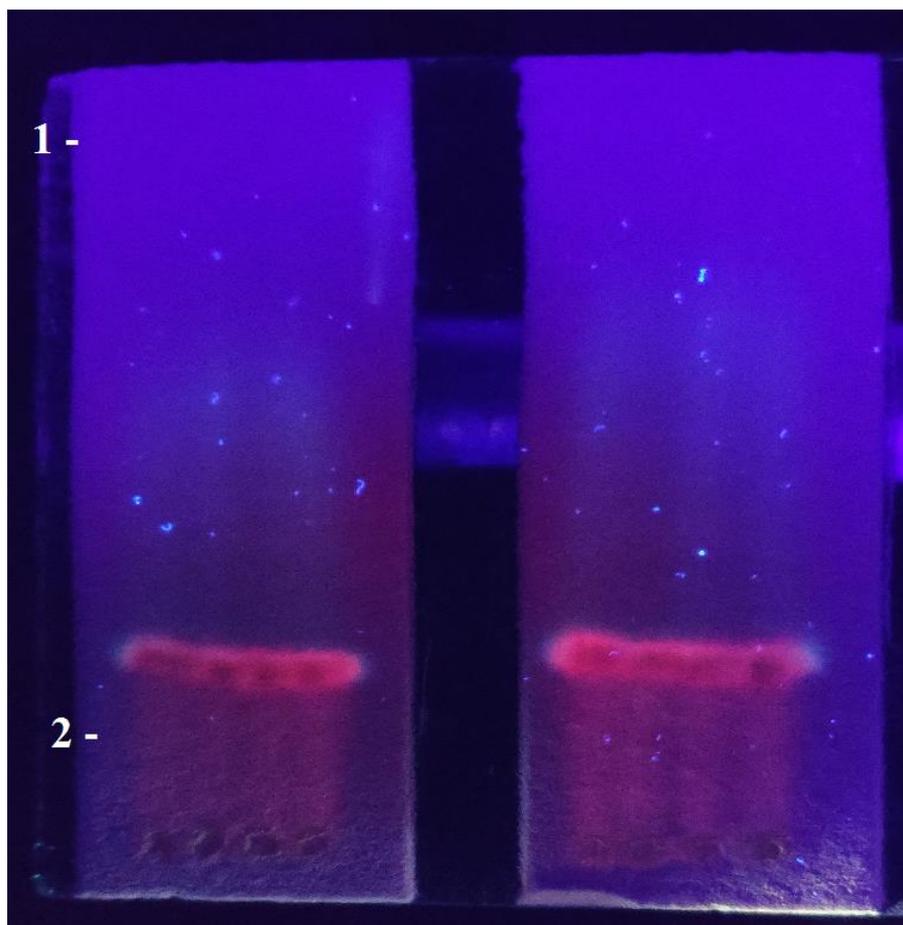


Рисунок 23 – Вид хроматограммы экстракта сине-зеленых водорослей под УФ-светом ($\lambda_{\text{возб}} = 366 \text{ нм}$): 1 – зона углеводов; 2 – зона хлорофилла

После хроматографирования УВ элюировали четыреххлористым углеродом. Элюат постепенно переносили в лодочки из фольги для взвешивания и выпаривали до постоянного веса. Полученные весовым методом результаты показали, что в 1 мг разных видов фитопланктона содержится от 0.004 мг до 0.007 мг биогенных углеводов (таблица 8).

Таблица 8 – Содержание УВ в липидных фракциях фитопланктона

| Виды фитопланктона | Количество фитопланктона, мг | Содержание липидов, мг | Содержание УВ в липидной фракции, мг | Содержание УВ в 1 мг фитопланктона, мг |
|--|------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--|
| <i>Synechococcus</i> (сине-зеленые) | 131 | 7.26 | 0.76 | 0.006 |
| <i>Prorocentrum cordatum</i> (Ostenf) (динофитовые) | 187 | 10.37 | 0.87 | 0.005 |
| <i>Chaetoceros curvisetus</i> (диатомовые) | 158 | 7.12 | 0.61 | 0.004 |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (диатомовые) | 190 | 9.45 | 0.75 | 0.004 |
| <i>Spirulina platensis</i> (сине-зеленые) | 109 | 6.55 | 0.72 | 0.007 |
| <i>Tetraselmis viridis</i> (зеленые) | 160 | 9.91 | 0.88 | 0.006 |

Согласно полученным данным содержание липидов в различных видах фитопланктона варьировало от 4.5 % до 6.2 %, а углеводороды составляли от 8 – 11 % от общей массы липидов (таблица 9). Эти результаты согласуются с данными из литературных источников, по которым количество липидных фракций в различных видах водорослей варьирует в пределах 0.5-15 %, а углеводороды составляют 7-12 % от массы липидов [18, 163].

Таблица 9 – Процентное содержание биогенных УВ в липидных фракциях фитопланктона

| Виды фитопланктона | Количество фитопланктона, мг | Содержание липидов, % | Содержание УВ в липидной фракции, % | Содержание УВ в фитопланктоне, % |
|---|------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Synechococcus</i> (сине-зеленые) | 131 | 5.54 | 10.47 | 0.58 |
| <i>Prorocentrum cordatum</i> (Ostenf.) (динофитовые) | 187 | 5.55 | 8.39 | 0.46 |
| <i>Chaetoceros curvisetus</i> (диатомовые) | 158 | 4.51 | 8.57 | 0.39 |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (диатомовые) | 190 | 4.97 | 7.94 | 0.39 |
| <i>Spirulina platensis</i> (сине-зеленые) | 109 | 6.0 | 11.00 | 0.66 |
| <i>Tetraselmis viridis</i> (зеленые) | 160 | 6.2 | 8.88 | 0.55 |

Согласно литературным данным, в составе *n*-алканов фитопланктона чаще всего преобладает *n*-C₁₇, иногда гомологи *n*-C₁₅, и *n*-C₁₉, составляющие более 90% всех алканов [45, 67, 68, 69, 152]. Jeremy L. Dahmen в своей работе при использовании масс-спектрометрических методов определения УВ, описывает доминирование C₂₇ в динофитовых водорослях *Pyrocystis lunula* [164].

В работе Ana Cabrerizo [84] показано, что в антарктической растительности преобладают нечетные и четные *n*-алканы. Во мхах и сосудистых растениях отмечено высокое содержание C_{27} , C_{31} , в то время как в лишайниках - C_{17} и C_{19} .

Индивидуальный состав *n*-алканов, выделенных из различных видов культивируемых нами водорослей, определяли на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и капиллярной хроматографической колонкой размером 30 м x 0.25 мм (фаза NB 1701). Идентификацию УВ проводили по стандартному образцу смеси парафиновых углеводородов в гексане с массовой концентрацией каждого компонента 1000 мкг/см³ (фирма «SUPELCO», США).

Выпаренные элюаты углеводородов после взвешивания растворяли в 100 мкл гексана, 1 мкл сконцентрированного элюата микрошприцем вместимостью 10 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Полученные хроматограммы углеводородов, выделенных из культивируемых в лабораторных условиях сине-зеленых водорослей *Spirulina platensis* и *Synechococcus* sp., характеризуются преобладанием гептадекана (рисунки 24, 25).

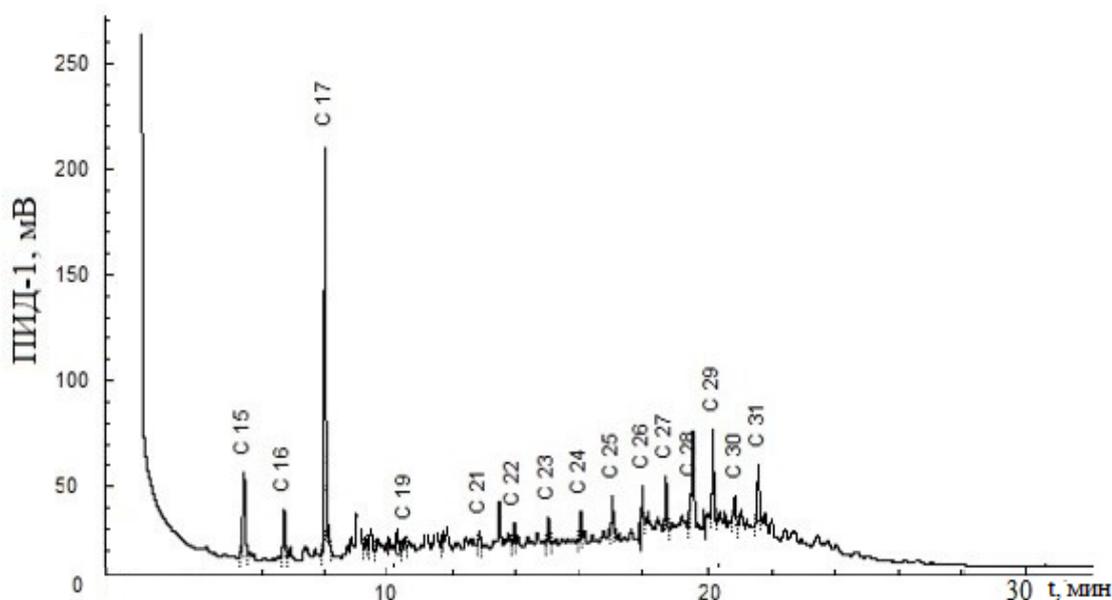


Рисунок 24 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из сине-зеленых водорослей (*Synechococcus* sp), культивируемых в лабораторных условиях

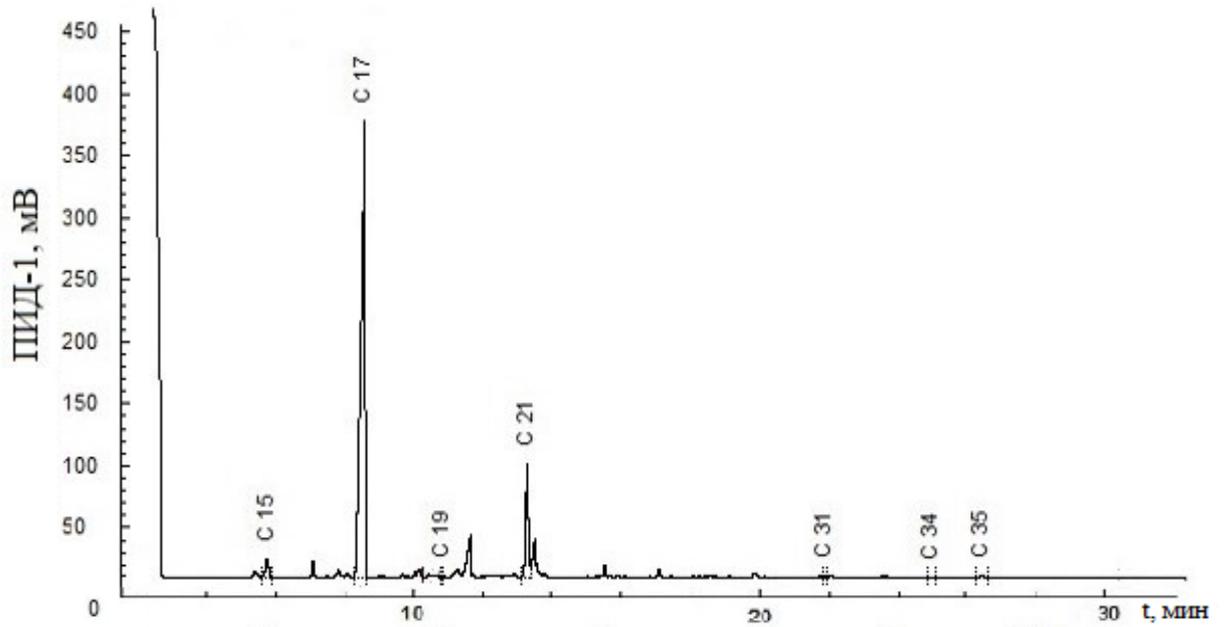


Рисунок 25 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из зеленых водорослей (*Spirulina platensis*), культивированных в лабораторных условиях

В составе *n*-алканов выделенных из культуры зеленой водоросли *Tetraselmis viridis*, значительно преобладали углеводороды с нечетным числом атомов углерода C₁₇, C₂₁, C₂₅ (рисунок 26).

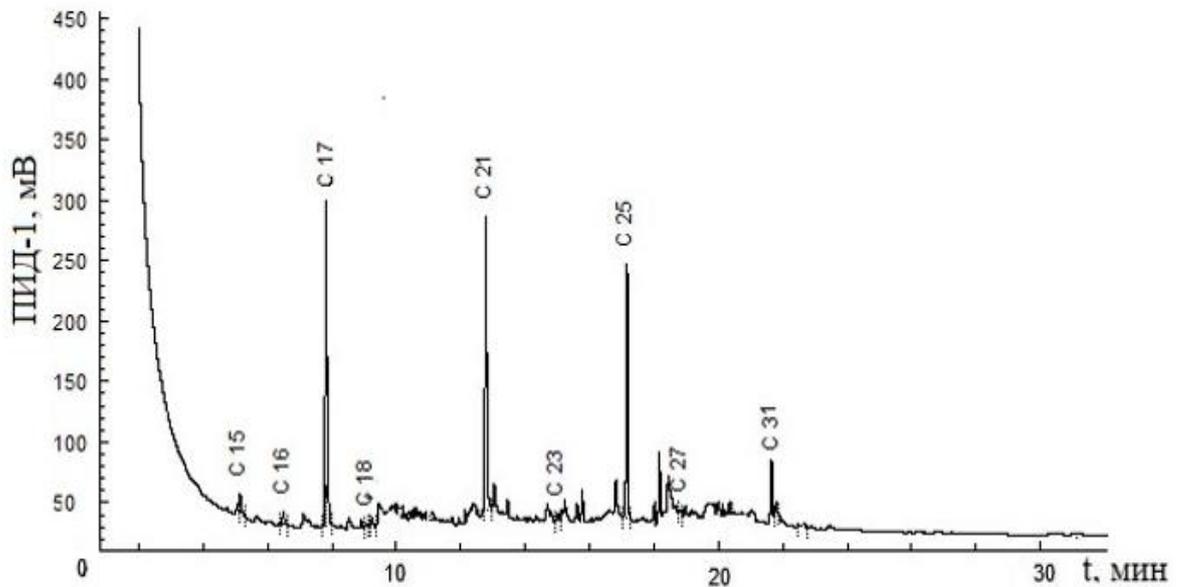


Рисунок 26 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из зеленых водорослей (*Tetraselmis viridis*), культивированных в лабораторных условиях

Рядом авторов [71, 165 - 167] также было отмечено доминирование н-алканов C_{21} , C_{23} , C_{25} , которые входят в воскоподобный слой, выполняющий у водорослей защитные функции. В многочисленных видах фитопланктона в качестве основного алкана был идентифицирован полиолефин НЕН - *cis*-3,6,9,12,15,18- гениекозанексан, доля которого может достигать 30-40 % от общего количества УВ [168 - 170].

Хроматограммы углеводородов, выделенных из культуры диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* характеризуются преобладанием н-алкана C_{21} , а из диатомовой водоросли *Chaetoceros curvisetus* Cleve - наличием гомологического ряда с максимумом C_{31} (рисунок 27). В динофитовых водорослях отмечено монотонное распределение н-алканов в высокомолекулярной области - C_{26} – C_{31} с максимумом при C_{29} (рисунок 28).

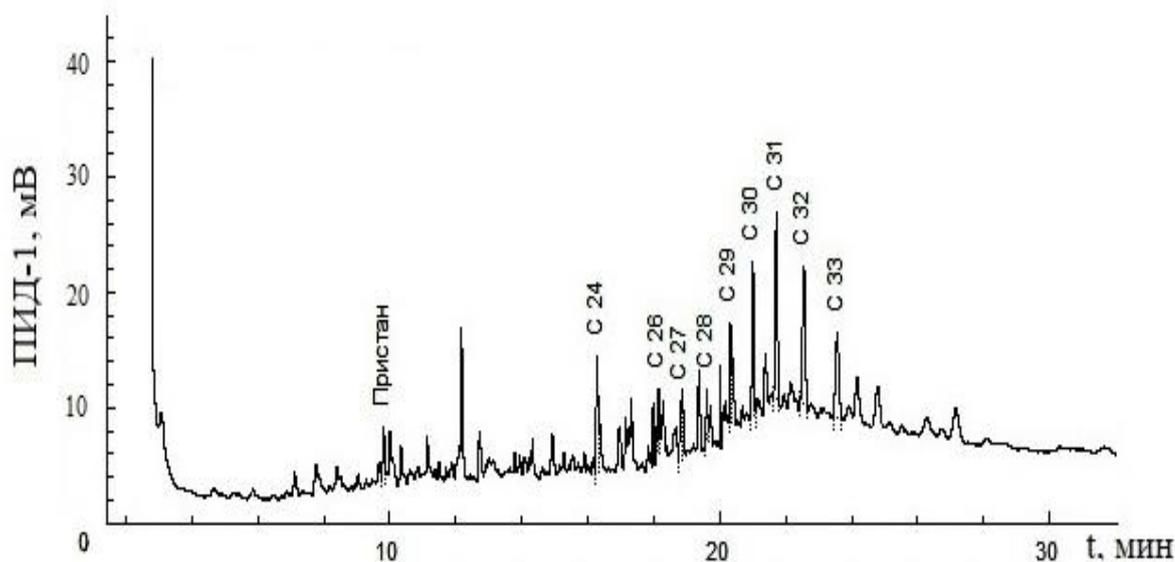


Рисунок 27 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из диатомовых водорослей (*Chaetoceros curvisetus*), культивируемых в лабораторных условиях

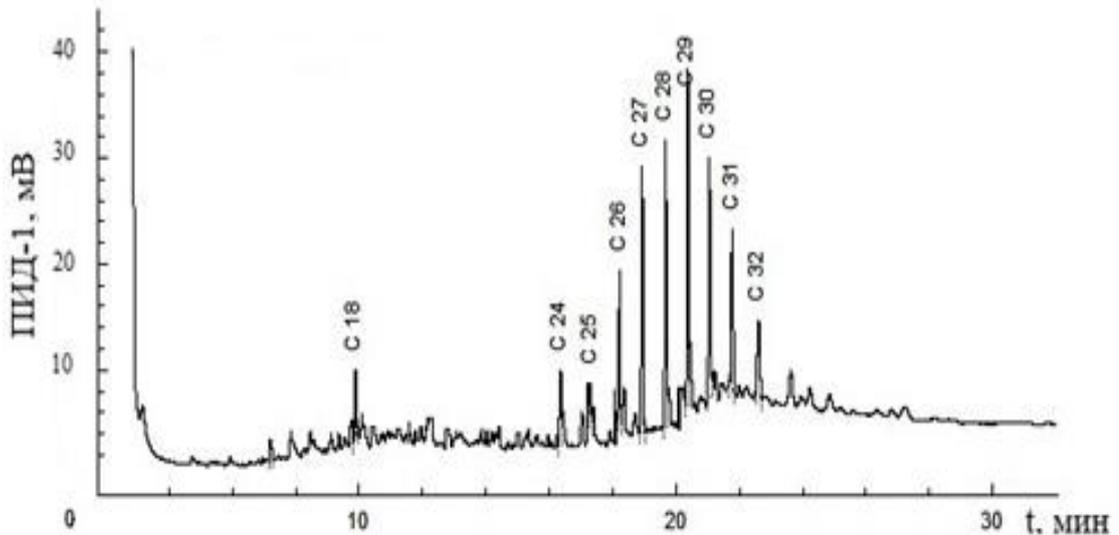


Рисунок 28 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из динофитовых водорослей (*Prorocentrum cordatum* (Ostenf.)), культивируемых в лабораторных условиях

2.5 Определение хлорофилла "a" в морских и пресных водных объектах

Поскольку основными продуцентами биогенных УВ в водной экосистеме Азовского моря являются планктонные организмы, то для количественной оценки биогенных УВ представлялось логичным использовать данные о биомассе фитопланктона и содержании в нем УВ. Основным показателем фотосинтетической активности фитопланктона является концентрация хлорофилла "a". Для основных трофических типов водоемов характерными концентрациями хлорофилла "a" являются: от 0.1 до 1.0 мкг/дм³ для олиготрофных; от 1.0 до 10 мкг/дм³ для мезотрофных; свыше 10 мкг/дм³ для эвтрофных.

2.5.1 Выбор условий определения хлорофилла "a" в воде

При анализе природных вод с низким содержанием хлорофилла "a" существующие методы требуют фильтрации больших объемов проб воды. Важным аспектом выбора условий детектирования является обоснование условий детектирования аналита. Для уменьшения объема проб воды, трудозатрат и повышения чувствительности определения хлорофилла "a" в природных водах была разработана методика, в основу которой положен экстракционно-флуоресцентный метод.

Интенсивность флуоресценции, помимо природы аналита и его концентрации, зависит от свойств растворителя, в котором находится флуоресцирующее вещество. Для изучения экстракции пигментов из воды без стадии фильтрования пробы через мембранный фильтр использовали три растворителя – гексан, четыреххлористый углерод, хлороформ, обладающие низкой растворимостью в воде. Из этих растворителей более высоким дипольным моментом обладает хлороформ, дипольный момент которого составляет 1.06, а гексана и тетрахлорметана – 0.

Хлорофиллы "b", "c", "d" в условиях экстракции хлорофилла "a" также извлекаются в органическую фазу. Однако мешающее влияние этих пигментов будет мало, поскольку хлорофиллы "c" и "d" в незначительных количествах встречаются в немногочисленных видах водорослей. По данным [170, 171] содержание хлорофилла "d" в водорослях водных экосистем не превышает 3-4 % от концентрации хлорофилла "a". Содержание хлорофилла "c" в изученных объектах еще ниже. В некоторых видах водорослей, наряду с хлорофиллом "a", присутствует хлорофилл "b", но максимум спектра его флуоресценции сдвинут примерно на 20 нм в более короткую область по сравнению с хлорофиллом "a", поэтому детектированию аналита он не мешает (рисунок 29). Для хлорофилла "a" максимумы спектров поглощения – 660 нм и 430 нм, для хлорофилла "b" – 644 нм и 450 нм [118, 172, 173].

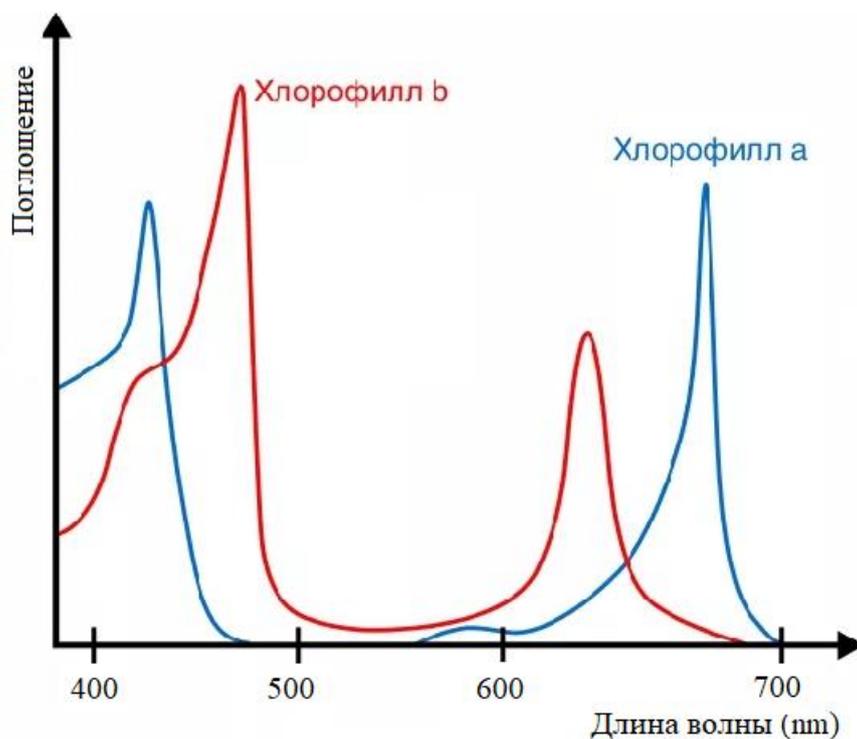


Рисунок 29 – Спектры поглощения хлорофиллов "a" и "b"

Следует отметить, что соотношение пиковых длин волн спектров поглощения хлорофиллов "a" и "b" является важным фактором при исследовании процессов фотосинтеза, по нему определяется эффективность поглощения света.

Спектры флуоресценции растворов хлорофилла "a" в гексане, четыреххлористом углероде и хлороформе с концентрацией 6 нг/мл, зарегистрированные на спектрофлуориметре RF-5301 PC, при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм, показали, что наибольшая интенсивность флуоресценции для раствора хлорофилла "a" наблюдается в хлороформе (рисунок 30).

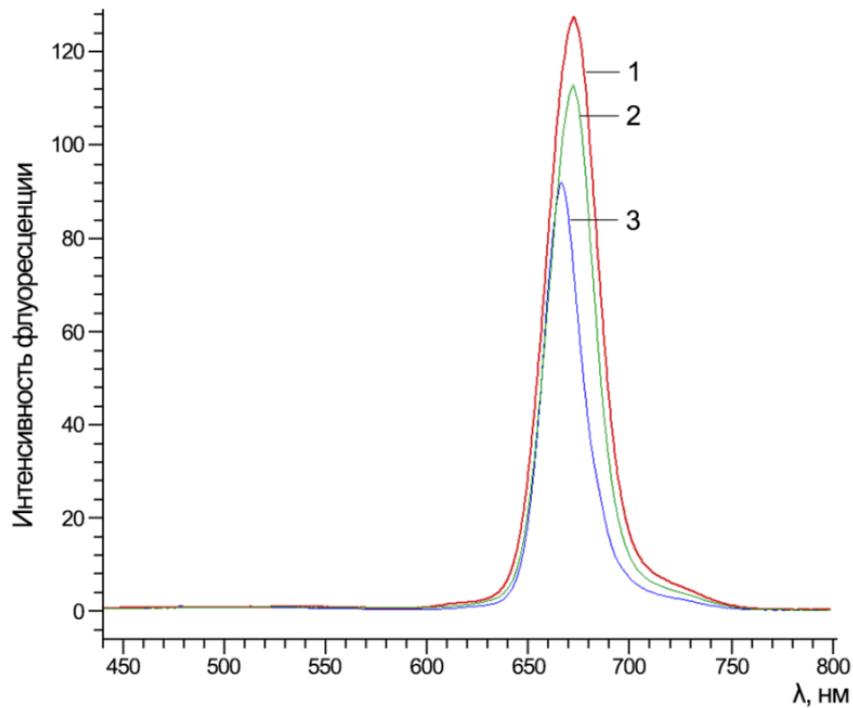


Рисунок 30 – Спектры флуоресценции растворов хлорофилла "а" в хлороформе (1), четыреххлористом углероде (2) и гексане (3).

В экспериментах использовали хлороформ, который перегоняли для удаления примесей, отбирая фракцию с температурой кипения 61.2 °С. Критерием чистоты хлороформа является отсутствие люминесценции при $\lambda_{\text{возб}} = 400\text{-}420$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 600\text{-}700$ нм. Сернокислый натрий перед употреблением высушивали при температуре от 105 °С до 110 °С в течение 8 часов. Вату промывали хлороформом в аппарате Сокслета в течение 14 ч, сушили. Посуду, используемую при отборе и анализе проб, тщательно мыли хромовой смесью, несколько раз ополаскивали сначала водопроводной, затем дистиллированной водой. Посуду сушили в сушильном шкафу. Сухую охлажденную посуду ополаскивали 3-4 раза хлороформом. Посуда считается чистой, если хлороформ, которым ополаскивали посуду, не люминесцирует при $\lambda_{\text{возб}} = 400\text{-}420$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 600\text{-}700$ нм.

Калибровочный график строили по стандартному раствору с массовой концентрацией хлорофилла "а" 10 мкг/см³, приготовленный из стандарта «С5753-1 мг», содержащего 1 мг хлорофилла "а". Содержимое вскрытой ампулы количественно переносили в мерную колбу, вместимостью 100 см³, омывая

внутреннюю поверхность ампулы хлороформом с помощью шприца. Доводили раствор в колбе до метки хлороформом и перемешивали. Полученный раствор хранили обернутым плотной черной бумагой в холодильнике. Для построения калибровочных растворов из основного раствора с концентрацией 10 мкг/см^3 отбирали 200 мкл микрошприцем вместимостью 500 мкл, вносили в градуированную пробирку вместимостью 10 см^3 и доводили до метки хлороформом. Полученную концентрацию 200 нг/мл разбавляли в два раза, для получения концентрации 100 нг/см^3 . Таким образом построение калибровочных растворов продолжалось до концентрации 5 нг/см^3 . Интенсивность флуоресценции градуированного графика измеряли в день построения на приборах: спектрофлуориметре RF-5301 PC (фирма Shimadzu) и спектрофлуориметре RF-510 (фирма Shimadzu). Условия измерения интенсивности флуоресценции представленные в таблице 10.

Коэффициент калибровки градуировочного графика на спектрофлуориметре RF-5301 PC получили равным 19.783. На спектрофлуориметре RF-510 = 0.6036 (рисунок 31).

Таблица 10 - Условия измерения интенсивности флуоресценции

| | |
|---------------------------|--------|
| Excitation wavelenght | 418 |
| Emission start wavelenght | 440 |
| Emission Stop wavelenght | 800 |
| Excitation slit width | 10 нм |
| Emission slit width | 10 нм |
| Speed | Medium |
| Time | auto |
| Sampling interval | 0.2 нм |

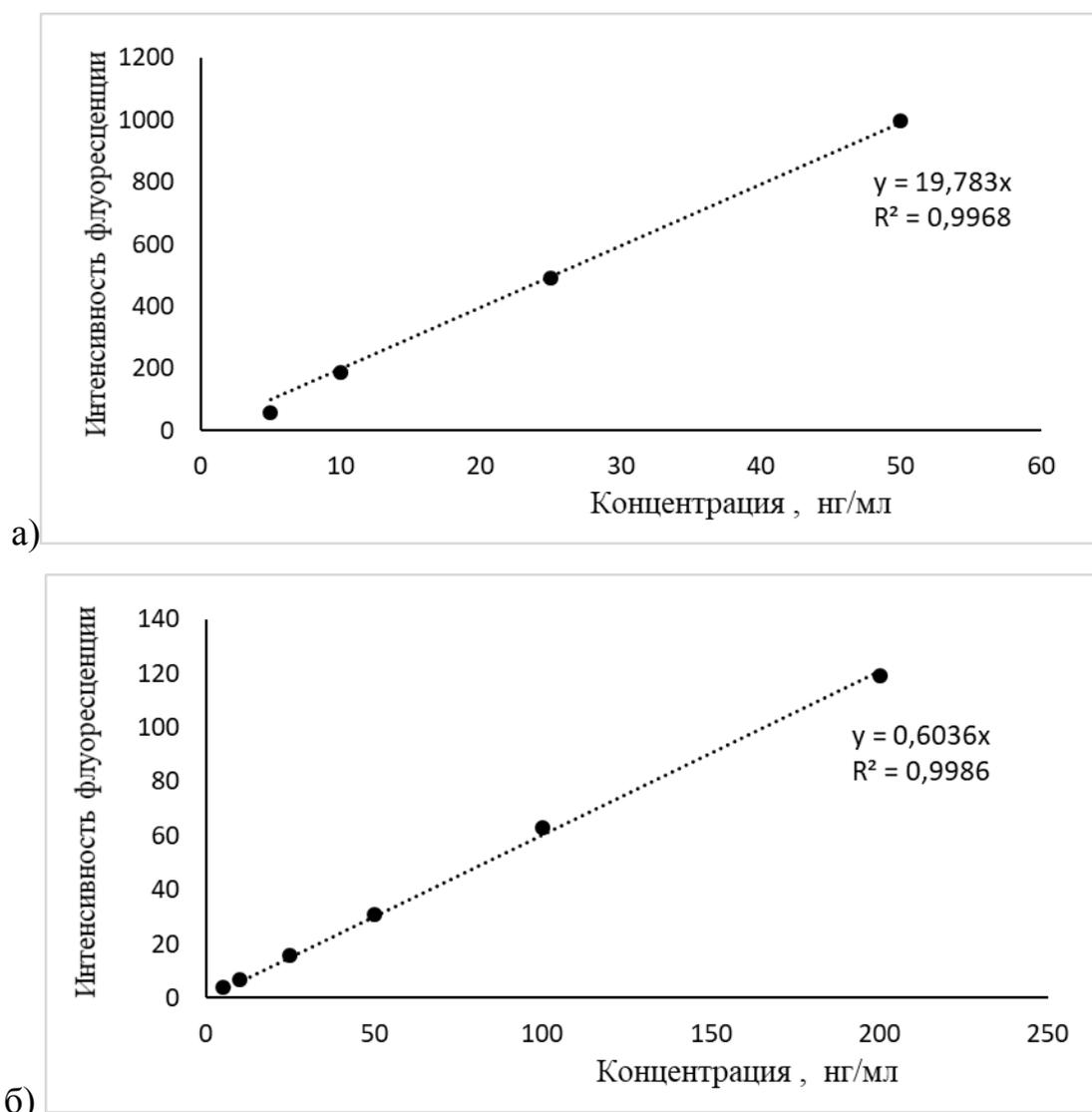


Рисунок 31 – Градуировочный график хлорофилла "a" на спектрофлуориметре RF-5301 PC (а) и RF-510 (б)

Градуировочные растворы после построения калибровочного графика хранили в темном месте при $t = +4$ °С. Измеряли интенсивность флуоресценции через 2-3 дня, в течение месяца, чтобы удостовериться в отсутствии разрушения хлорофилла "a", находящегося в хлороформе.

Оптимизацию условий экстракции хлорофилла "a" проводили на модельных пробах, приготовленных на дистиллированной воде с известными добавками хлорофилла "a". Для этого в 6 склянок с 1000 см^3 дистиллированной воды добавляли по 10 мкг стандарта хлорофилла "a". Экстракцию аналита хлороформом из приготовленных растворов проводили с использованием

механического встряхивателя. Из первых трех проб аналит экстрагировали в четыре стадии по 20 минут, добавляя во время первой стадии 20 мл, а затем по 10 мл хлороформа. Из других трех проб аналит экстрагировали хлороформом также в четыре стадии, но продолжительностью в 10 минут, каждый раз добавляя по 10 мл растворителя. После каждой экстракции интенсивность люминесценции полученных экстрактов хлорофилла "а" измеряли на при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм. Концентрации выделенного хлорофилла "а" определяли по градуировочному графику, построенному по стандартному образцу хлорофилла "а" в хлороформе.

Экспериментальные данные по степени извлечения хлорофилла "а" из воды на различных стадиях экстракции хлороформом приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Извлечение хлорофилла "а" хлороформом на различных этапах экстракции, %

| Номер пробы | Объем CHCl_3 , мл* | Время экстракции, мин | Этапы экстракции | | | |
|-------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|----|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 50 | 20 | 55 | 22 | 7 | 3 |
| 2 | 50 | 20 | 56 | 23 | 4 | 3 |
| 3 | 50 | 20 | 59 | 20 | 5 | 2 |
| 4 | 40 | 10 | 60 | 20 | 5 | 2 |
| 5 | 40 | 10 | 58 | 21 | 4 | 3 |
| 6 | 40 | 10 | 61 | 20 | 3 | 2 |

Примечание: * - в таблице указан суммарный объем CHCl_3 всех четырех этапов экстракции. В пробах 1-3 для проведения первой экстракции добавляли 20 мл растворителя, для проведения последующих экстракций объем растворителя составлял 10 мл.

После первой экстракции степень извлечения хлорофилла "а" из воды хлороформом варьировала от 55 до 61 %, второй – от 20 до 23 %, третьей – от 3 до

7 %, четвертой – от 2 до 3 %. При трехкратной десятиминутной экстракции хлороформом объемом по 10 мл извлекается до 85 % хлорофилла "а", содержащегося в исследуемой пробе.

Сравнение разработанной экстракционно-флуориметрической методики и наиболее распространенной стандартной методики (ГОСТ 17.1.4.02-90) определения хлорофилла "а" в пробах воды с известными добавками хлорофилла "а" показало, что добавка 0.05 мкг аналита в 1000 см³ воды обнаруживается только флуориметрическим методом (обнаружено 80-86 % хлорофилла "а"), а спектрофотометрическим методом аналитический сигнал не регистрируется (таблица 12). При введении концентраций хлорофилла "а" выше 0.200 мкг при определении спектрофотометрическим методом наблюдаются завышенные концентрации (142.5-165 %), а предлагаемым вариантом экстракционно-флуоресцентной методики отмечается удовлетворительная сходимость данных (в пределах 95-105 %).

Проводили также сравнение результатов определения хлорофилла "а" стандартизированной и экстракционно-флуориметрической методиками в реальных пробах воды, отобранных в р. Дон, в Курчанском лимане и Таганрогском заливе в осенний период 2017 г. и в Темрюкском заливе в летний и осенний периоды 2018 года. Для этого пробы воды отбирали из поверхностного слоя воды, затем каждую пробу воды делили на две части. На месте отбора одну часть (1000 см³) фильтровали через мембранный фильтр (стекловолоконный фильтр, GF/F), фильтры помещали в колбы и фиксировали 90 % ацетоном. Другую часть (1000 см³) – сразу после отбора пробы фиксировали 10 мл хлороформа. Последующие этапы анализов проводили в стационарной лаборатории.

Таблица 12 – Результаты определения хлорофилла "а" в пробах воды

| Введено хлорофилла "а", мкг | Флуоресцентный метод | | Спектрофотометрический метод (ГОСТ 17.1.4.02-90) | |
|-----------------------------------|-------------------------|-----|---|-----|
| | найдено | | найдено | |
| | С, мкг/л | % | С, мкг/л | % |
| 0.050 | 0.042 | 84 | н/обн. | - |
| | 0.040 | 80 | н/обн. | - |
| | 0.043 | 86 | н/обн. | - |
| 0.200 | 0.210 | 105 | 0.330 | 165 |
| | 0.190 | 95 | 0.300 | 150 |
| | 0.200 | 100 | 0.310 | 155 |
| 0.400 | 0.400 | 100 | 0.560 | 140 |
| | 0.420 | 105 | 0.590 | 148 |
| | 0.400 | 100 | 0.570 | 143 |

Оптическую плотность ацетоновых экстрактов из фильтров измеряли на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) до подкисления при $\lambda = 750, 664, 647$ и 630 нм, а также после подкисления при $\lambda = 750$ и 664 нм. Интенсивность флуоресценции экстрактов проб, зафиксированных хлороформом, измеряли при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм.

Результаты проведенных измерений сведены в таблицах 13, 14. Расхождения между значениями концентраций хлорофилла "а", полученными спектрофотометрическим и флуоресцентным методами в воде Таганрогского залива составили 8-13 %, в р. Дон – 21-42 %, в Курчанском лимане – 11-25 %, в Темрюкском заливе - в летний период от 11-30 %, а в осенний период от 19-48 %.

Таблица 13 – Концентрации хлорофилла "а" в воде Таганрогского залива, р. Дон и Курчанского лимана, обнаруженные стандартным спектрофотометрическим и флуоресцентным методами

| Место отбора проб | Станции отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мкг/л | | Расхождение результатов % |
|--------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | флуоресцентный метод | спектрофотометрический метод | |
| Таганрогский залив | 1 | 9.7 | 10.5 | 8 |
| | 2 | 7.9 | 7.3 | 8 |
| | 3 | 12.2 | 10.6 | 13 |
| р. Дон | 1 | 1.1 | 1.4 | 21 |
| | 2 | 1.2 | 1.8 | 33 |
| | 3 | 1.5 | 2.6 | 42 |
| Курчанский лиман | 1 | 9.0 | 11.3 | 20 |
| | 2 | 14.3 | 16.9 | 15 |
| | 3 | 28.2 | 31.7 | 11 |
| | 4 | 19.1 | 25.2 | 24 |
| | 5 | 26.8 | 22.8 | 15 |
| | 6 | 15.3 | 11.5 | 25 |
| | 7 | 51.2 | 58.1 | 12 |

Расхождение результатов имело как положительное, так и отрицательное отклонение. Наиболее существенное расхождение отмечено в пробах из р. Дон и Темрюкского залива, отобранных в осенний период времени. В данных пробах концентрации хлорофилла "а" были достаточно низкими, но при этом результаты спектрофотометрических определений были существенно выше результатов, полученных флуоресцентным методом.

Таблица 14 – Концентрации хлорофилла "а" в воде Темрюкского залива в летний и осенний периоды 2018 г., обнаруженные стандартным спектрофотометрическим и флуоресцентным методами

| Сезон отбора проб | Станции отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мкг/л | | Расхождение результатов % |
|-------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| | | флуоресцентный метод | спектрофотометрический метод | |
| Летний период | 1 | 19.0 | 25.2 | 25 |
| | 2 | 18.5 | 15.5 | 18 |
| | 3 | 28.1 | 31.7 | 11 |
| | 4 | 14.2 | 17.0 | 17 |
| | 5 | 8.2 | 11.3 | 27 |
| | 6 | 8.8 | 12.6 | 30 |
| | 7 | 18.3 | 22.2 | 18 |
| Осенний период | 1 | 1.3 | 1.6 | 19 |
| | 2 | 1.1 | 2.0 | 45 |
| | 3 | 0.9 | 1.2 | 25 |
| | 4 | 1.3 | 1.7 | 24 |
| | 5 | 1.6 | 3.1 | 48 |

При проведении анализа реальных образцов важно влияние матрицы, зависящей от типа анализируемой воды. Huang T.L, Qiu N и Qin J.G. [115 - 117] подробно изучили условия экстракции хлорофилла "а" из различных типов вод. Полученные данные позволяют утверждать, что соленость воды не ограничивает использование флуоресцентной методики, так как процедура экстракции аналита нивелирует влияние данного фактора. Это экспериментально подтверждено на объектах морских (Азовское море) и пресных вод (р. Дон, Курчанский лиман).

2.5.2 Метрологическая характеристика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "a" в водах

По результатам проведенных исследований проведена метрологическая аттестация разработанной методики. При соблюдении всех регламентируемых условий проведения методики измерений характеристики погрешности результатов измерения с вероятностью 0.95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 15.

Таблица 15 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности, при принятой вероятности 0.95

| Диапазон концентраций хлорофилла "a", мкг/дм ³ | Показатель повторяемости, σ_r , % | Показатель воспроизводимости, σ_R , % | Показатель правильности, Δ_c , % | Показатель точности, $\pm\delta$, % |
|---|--|--|---|--------------------------------------|
| От 0.1 до 0.25 включ. | 4 | 5 | 5 | 14 |
| Св.0.25 до 5.0 включ. | 2 | 5 | 3 | 11 |

Предел определения хлорофилла "a" в пресных и морских водах составляет 0,1 мкг/дм³, предел обнаружения – 0.05 мкг/дм³. Методика предусматривает поправочные коэффициенты, учитывающие потери хлорофилла "a" при экстракции анализируемой пробы и последующих стадиях анализа, установленные экспериментально добавлением известных количеств хлорофилла "a" к пробам воды. Поправочный коэффициент при концентрации 0.1 мкг/дм³ равен 1.6, свыше 0.1 до 0.5 мкг/дм³ – 1.5, свыше 0.5 мкг/дм³ – 1.3.

При использовании экстракционно-флуориметрической методики определения хлорофилла "a" объем отбираемой пробы воды может варьировать

от 100 до 1000 см³, в зависимости от трофности водоема. При высокой интенсивности флуоресценции экстрактов хлорофилла "а" необходимо проводить его предварительное разбавление для исключения явления концентрационного тушения.

Разработанная методика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "а" в пробах природных (пресных и морских) вод (МИ 02067847.09-2018 «Массовая концентрация хлорофилла "а" в природных (пресных и морских) водах») включена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений под шифром ФР.1.31.2019.33562 [174].

Методика определения хлорофилла "а" в природных (пресных и морских) водах люминесцентным методом и её метрологические характеристики приведены в Приложении.

2.6 Определение УВ с учетом процессов их трансформации и происхождения

С учетом сложности и непостоянства состава компонентов нефти и нефтепродуктов, поступающих в водные объекты, и присутствия природного (биогенного) углеводородного фона, разработана схема анализа нефтяного загрязнения природных вод при проведении экологического мониторинга с учетом процессов трансформации и происхождения углеводородов (рисунок 32).

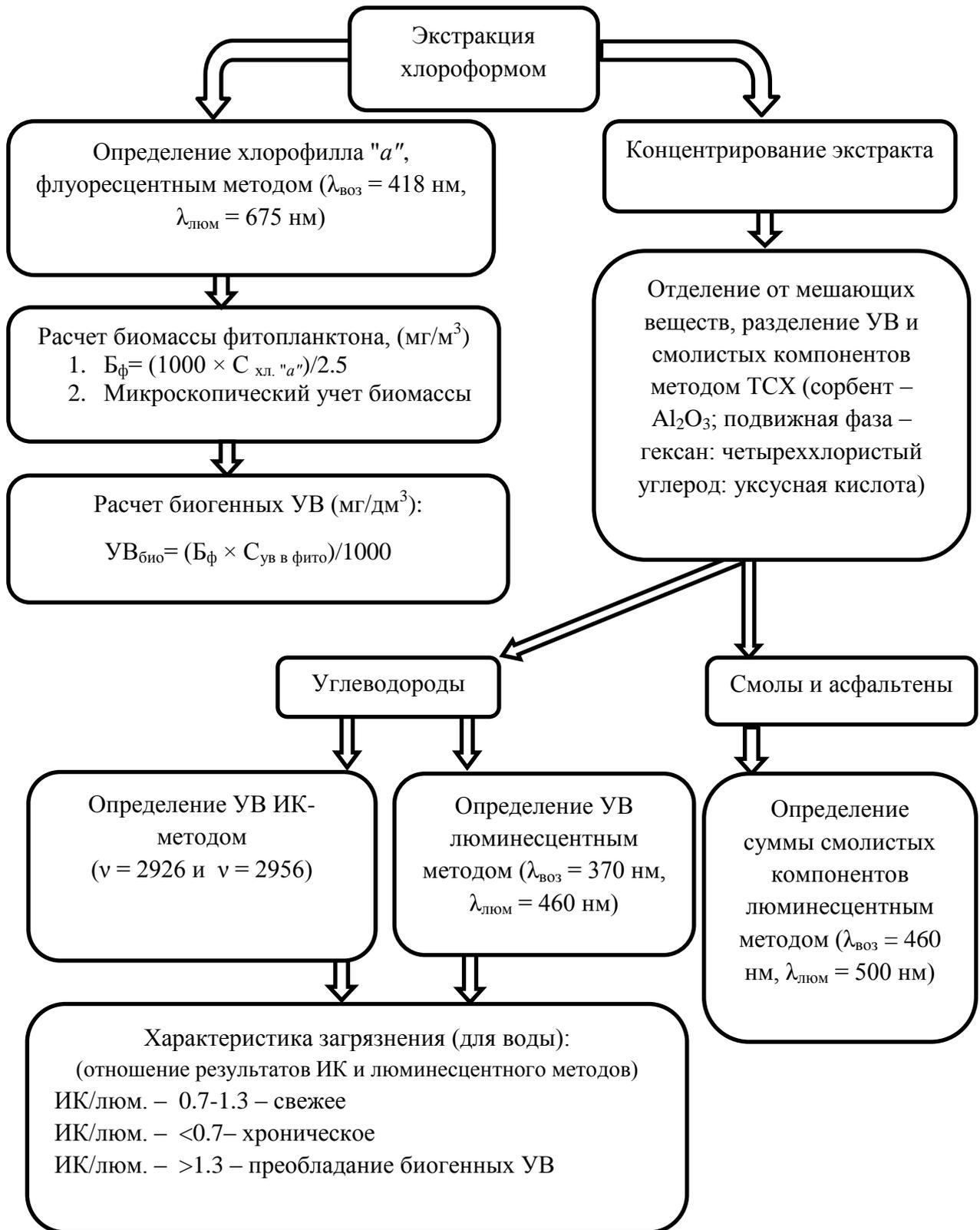


Рисунок 32 – Схема анализа нефтяного загрязнения природных вод с учетом процессов трансформации и происхождения углеводородов

Схема анализа включает экстракцию воды хлороформом, измерение интенсивности флуоресценции экстракта на спектрофлуориметре RF-5301PC при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм, $\lambda_{\text{люом}} = 675$ нм для расчета концентрации хлорофилла "а". Далее концентрирование экстракта, разделение экстракта на основные нефтяные компоненты (углеводороды, смолы и асфальтены) методом тонкослойной хроматографии, элюировании зоны углеводородов четыреххлористым углеродом, зон смол и асфальтенов – хлороформом, измерение оптических характеристик элюата УВ (интенсивность поглощения в ИК-области по сумме интенсивностей полос поглощения при $\nu=2926$ см⁻¹ и $\nu=2956$ см⁻¹ и интенсивности люминесценции при $\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{люом}} = 460$ нм, соответственно, на ИК-спектрофотометре IR-Prestige-21 фирмы Shimadzu и спектрофлуориметре RF-5301PC фирмы Shimadzu), измерение интенсивности люминесценции элюата смол и асфальтенов.

Предлагаемая схема анализа позволяет определять по содержанию хлорофилла долю биогенных УВ и по отношению интенсивности поглощения (Е) в ИК-области спектра к интенсивности люминесценции (I) - степень трансформации нефтяного загрязнения. При значениях отношения $E/I < 0.7$ загрязнение характеризуется как хроническое, в интервале 0.7–1.3 – как свежее, а при > 1.3 – свидетельствует о преобладании УВ биогенного происхождения. Это обусловлено тем, что люминесценцию углеводородной фракции обеспечивают более стойкие к процессам деградации полициклические ароматические углеводороды, а поглощение в ИК-области спектра – алифатические УВ, в составе которых в первую очередь деградируют парафиновые УВ. При свежем загрязнении результаты люминесцентного и ИК-методов различаются в пределах погрешности используемых методик (± 30 %).

Расчет биогенных УВ (мг/дм³) рассчитывается по формуле (2):

$$\text{УВ}_{\text{био}} = (\text{Б}_{\text{ф}} \times \text{C}_{\text{ув в фито}}) / 1000 \quad (2)$$

где $\text{C}_{\text{ув в фито}}$ – содержание углеводородов в 1 мг липидных фракций фитопланктона (мг);

B_{ϕ} – биомасса фитопланктона ($\text{мг}/\text{м}^3$)

Микроскопический анализ для определения видов и биомассы фитопланктона в естественных пробах является стандартным методом оценки [175]. Тем не менее, данный метод требует высокого уровня экспертизы, таксономических навыков и отнимает много времени [176]. В связи с этим провести ориентировочный расчёт биомассы фитопланктона можно по формуле Г.Г. Винберга [177], основанной на том, что содержание хлорофилла "а" составляет 2.5 % сухой биомассы фитопланктона, а биомасса составляет примерно 0.1 сырой массы фитопланктона. Исходя из этих данных, можно рассчитать биомассу фитопланктона ($\text{мг}/\text{м}^3$) (3):

$$B_{\phi} = ((C_{\text{хл. «а»}} \times 1000) / 2.5) \quad (3)$$

Для расчета биогенных углеводов, продуцируемых фитопланктоном, использовали данные, полученные экспериментальным путем, приведенные в таблице 8.

2.6.1 Апробация схемы оценки содержания биогенных углеводов в пресных и морских водных объектах

В качестве объектов исследования использованы пробы воды, отобранные в Азовском море и Курчанском лимане весной и летом 2017-2018 гг.

В 2017 году основную массу фитопланктона в собственно Азовском море составляли диатомовые и динофитовые водоросли. Развитие сине-зеленых водорослей было отмечено по всему Таганрогскому заливу.

Данные о количестве хлорофилла "а", биомассе фитопланктона, концентрации биогенных УВ в летний период 2017 г. в акватории Азовского моря приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Содержание УВ и хлорофилла "а" в общей биомассе фитопланктона в летний период 2017 г. в акватории Азовского моря

| Точки отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мг/дм ³ | Биомасса фитопланктона (расчёт по Винбергу), мг/м ³ | Содержание УВ _{био} в 1 мг фитопланктона, мг | Концентрация УВ _{био} , мг/дм ³ |
|-------------------|---|--|---|---|
| 1 | 26.04 | 10416 | 0.006 | 0.062 |
| 2 | 23.10 | 9240 | 0.006 | 0.055 |
| 3 | 21.51 | 8604 | 0.006 | 0.031 |
| 4 | 18.66 | 7464 | 0.006 | 0.045 |
| 5 | 12.34 | 4936 | 0.006 | 0.030 |
| 6 | 5.11 | 2044 | 0.006 | 0.012 |
| 7 | 6.39 | 2556 | 0.004 | 0.010 |
| 8 | 5.21 | 2084 | 0.004 | 0.008 |
| 9 | 4.22 | 1688 | 0.005 | 0.008 |
| 10 | 2.97 | 1188 | 0.005 | 0.006 |
| 11 | 3.68 | 1472 | 0.005 | 0.007 |
| 12 | 1.89 | 756 | 0.005 | 0.002 |
| 13 | 4.28 | 1712 | 0.004 | 0.007 |
| 14 | 3.62 | 1448 | 0.005 | 0.007 |
| 15 | 2.74 | 1096 | 0.005 | 0.005 |
| 16 | 3.32 | 1328 | 0.004 | 0.005 |
| 17 | 5.39 | 2156 | 0.004 | 0.009 |
| 18 | 4.63 | 1852 | 0.005 | 0.009 |
| 19 | 2.91 | 1164 | 0.005 | 0.006 |
| 20 | 9.32 | 3728 | 0.004 | 0.015 |
| 21 | 3.09 | 1236 | 0.005 | 0.006 |
| 22 | 3.74 | 1496 | 0.005 | 0.007 |

Продолжение таблицы 16

| Точки отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мг/дм ³ | Биомасса фитопланктона (расчёт по Винбергу), мг/м ³ | Содержание УВ _{био} в 1 мг фитопланктона, мг | Концентрация УВ _{био} , мг/дм ³ |
|-------------------|---|--|---|---|
| 23 | 6.08 | 2432 | 0.005 | 0.012 |
| 24 | 0.78 | 312 | 0.005 | 0.002 |
| 25 | 7.23 | 2892 | 0.004 | 0.012 |
| 26 | 4.86 | 1944 | 0.004 | 0.008 |
| 27 | 3.68 | 1472 | 0.005 | 0.007 |
| 28 | 4.73 | 1892 | 0.005 | 0.009 |
| 29 | 2.74 | 1096 | 0.004 | 0.004 |
| 30 | 7.34 | 2936 | 0.004 | 0.012 |
| 31 | 3.85 | 1540 | 0.005 | 0.008 |
| 32 | 2.59 | 1036 | 0.004 | 0.004 |

Максимальные концентрации УВ различного происхождения, обнаруженные ИК-спектрофотометрическим методом, были зафиксированы в западном и юго-восточном районах собственно моря и достигали 0.23 и 0.30 мг/дм³, что превышает ПДК в 4.6 и 6.0 раза. На некоторых станциях центрального и восточного районов моря концентрации УВ превышали ПДК в 1.2-3.0 раза. В Таганрогском заливе концентрации УВ в нескольких пробах составили от 1.2 до 3.4 ПДК (рисунок 33).

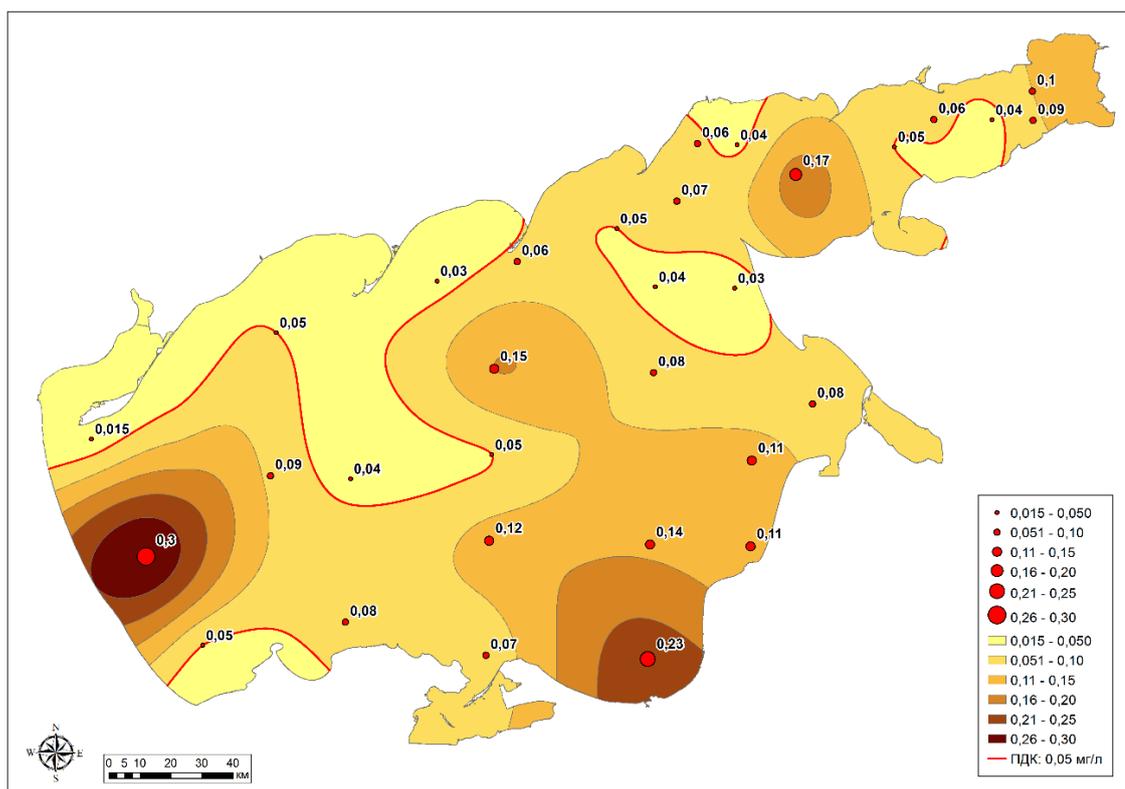


Рисунок 33 – Общее содержание углеводов в акватории Азовского моря, летний период 2017 г.

В Таганрогском заливе по биомассе доминировали сине-зеленые водоросли, в собственно море - диатомовые и динофитовые водоросли. Биомассу фитопланктона рассчитывали по концентрации хлорофилла "а", обнаруженной в исследуемых пробах воды разработанным флуоресцентным методом, количество биогенных УВ – по содержанию их в конкретных видах фитопланктона, найденному экспериментальным путем (таблица 8). Процентное содержание биогенных УВ в воде собственно моря от суммарной концентрации УВ варьировало в диапазоне 2.0 - 38.6 %. В Таганрогском заливе доля биогенных углеводов варьировала от 20 % до 74 % от общей суммы углеводов.

На рисунке 34 представлено распределение концентраций УВ за вычетом биогенного фона. В собственно море отмечено снижение превышения ПДК примерно на 10 %. В Таганрогском заливе во всех пробах воды концентрации УВ находились ниже ПДК.

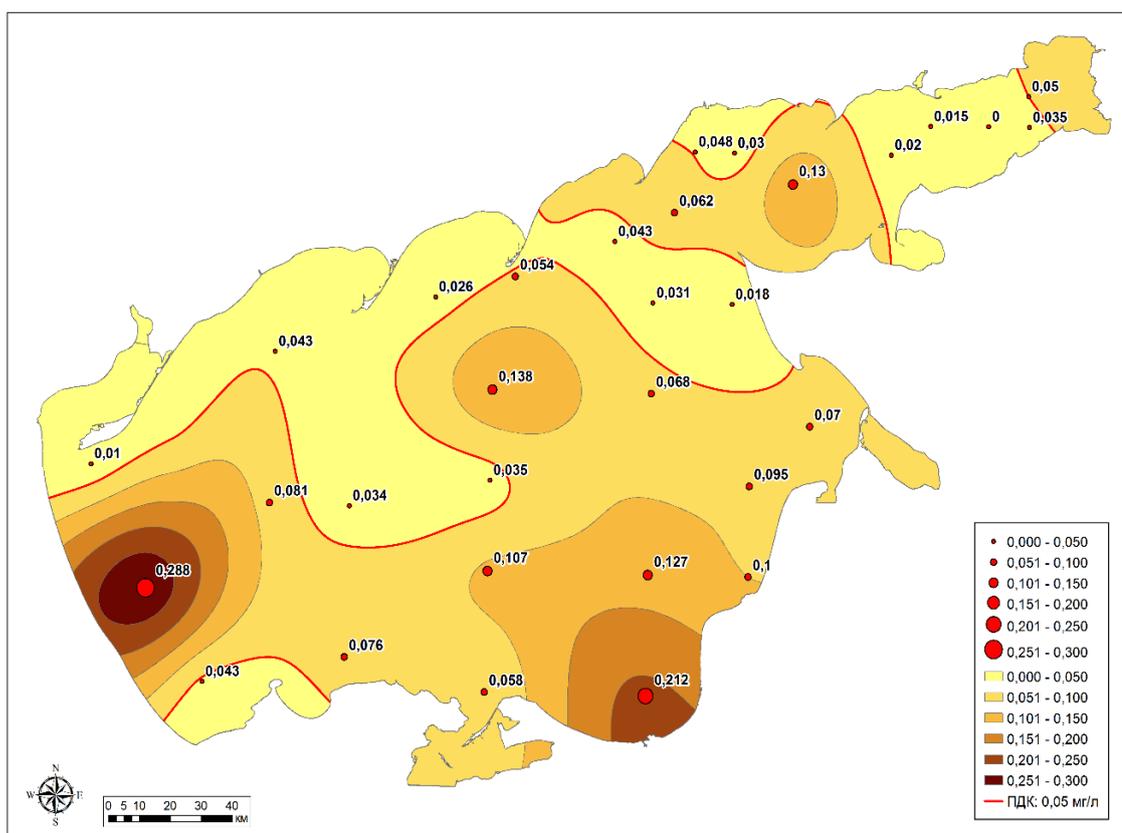


Рисунок 34 – Концентрации УВ в акватории Азовского моря за вычетом биогенного фона, летний период 2017 г.

Результаты аналогичных исследований, проведенных летом 2018 года, представлены в таблице 17. Основную массу фитопланктона в Азовском море составляли диатомовые и динофитовые водоросли. В Таганрогском заливе доминировали сине-зеленые водоросли.

Максимальные концентрации УВ различного происхождения отмечены в западном районе собственно моря и восточной части Таганрогского залива, составив 0.14 и 0.11 мг/дм³, соответственно. Вклад биогенных УВ в общую концентрацию УВ в акватории собственно моря составил от 4.5 % до 65.4 %, в Таганрогском заливе от 14 % до 89.2 %.

Таблица 17 – Содержание УВ и хлорофилла "а" в общей биомассе фитопланктона в летний период 2018 г в акватории Азовского моря.

| Точки отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мг/дм ³ | Биомасса фитопланктона (расчёт по Винбергу), мг/м ³ | Содержание УВ _{био} в 1 мг фитопланктона, мг | Концентрация УВ _{био} , мг/дм ³ |
|-------------------|---|--|---|---|
| 1 | 22.3 | 8920 | 0.006 | 0.054 |
| 2 | 24.20 | 9680 | 0.004 | 0.039 |
| 3 | 20.11 | 8044 | 0.006 | 0.048 |
| 4 | 21.80 | 8720 | 0.006 | 0.052 |
| 5 | 13.0 | 5200 | 0.006 | 0.031 |
| 6 | 4.20 | 1680 | 0.005 | 0.008 |
| 7 | 2.33 | 932 | 0.005 | 0.005 |
| 8 | 13.40 | 5360 | 0.006 | 0.032 |
| 9 | 3.80 | 1520 | 0.005 | 0.008 |
| 10 | 4.61 | 1844 | 0.004 | 0.007 |
| 11 | 4.51 | 1804 | 0.005 | 0.009 |
| 12 | 2.61 | 1044 | 0.004 | 0.004 |
| 13 | 3.90 | 1560 | 0.005 | 0.008 |
| 14 | 7.53 | 3012 | 0.004 | 0.015 |
| 15 | 11.80 | 4720 | 0.006 | 0.028 |
| 16 | 7.05 | 2820 | 0.005 | 0.014 |
| 17 | 3.14 | 1256 | 0.005 | 0.006 |
| 18 | 6.40 | 2560 | 0.004 | 0.010 |
| 19 | 11.11 | 4444 | 0.004 | 0.018 |
| 20 | 4.61 | 1844 | 0.005 | 0.009 |
| 21 | 9.81 | 3924 | 0.005 | 0.020 |

Продолжение таблицы 17

| Точки отбора проб | Концентрация хлорофилла "а", мг/дм ³ | Биомасса фитопланктона (расчёт по Винбергу), мг/м ³ | Содержание УВ _{био} в 1 мг фитопланктона, мг | Концентрация УВ _{био} , мг/дм ³ |
|-------------------|---|--|---|---|
| 22 | 9.31 | 3724 | 0.005 | 0.019 |
| 23 | 1.05 | 420 | 0.005 | 0.002 |
| 24 | 3.10 | 1240 | 0.004 | 0.005 |
| 25 | 6.0 | 2400 | 0.004 | 0.010 |
| 26 | 5.82 | 2328 | 0.004 | 0.009 |
| 27 | 2.82 | 1128 | 0.004 | 0.004 |
| 28 | 2.08 | 832 | 0.004 | 0.003 |
| 29 | 5.95 | 2380 | 0.004 | 0.010 |
| 30 | 4.11 | 1644 | 0.006 | 0.010 |
| 31 | 5.78 | 2312 | 0.005 | 0.012 |
| 32 | 6.51 | 2604 | 0.005 | 0.013 |

В восточной и западной части Таганрогского залива, а также в центральной и западной части собственно моря, было отмечено превышение ПДК. В Таганрогском заливе концентрации УВ превышали ПДК в 1.2 – 2.2 раза, западной районе собственно моря– в 1.2–2.8 раза. С учетом биогенного фона максимальные концентрации УВ в воде Таганрогского залива составили 1.8 ПДК, в собственно море – 2.6 ПДК (рисунки 35, 36).

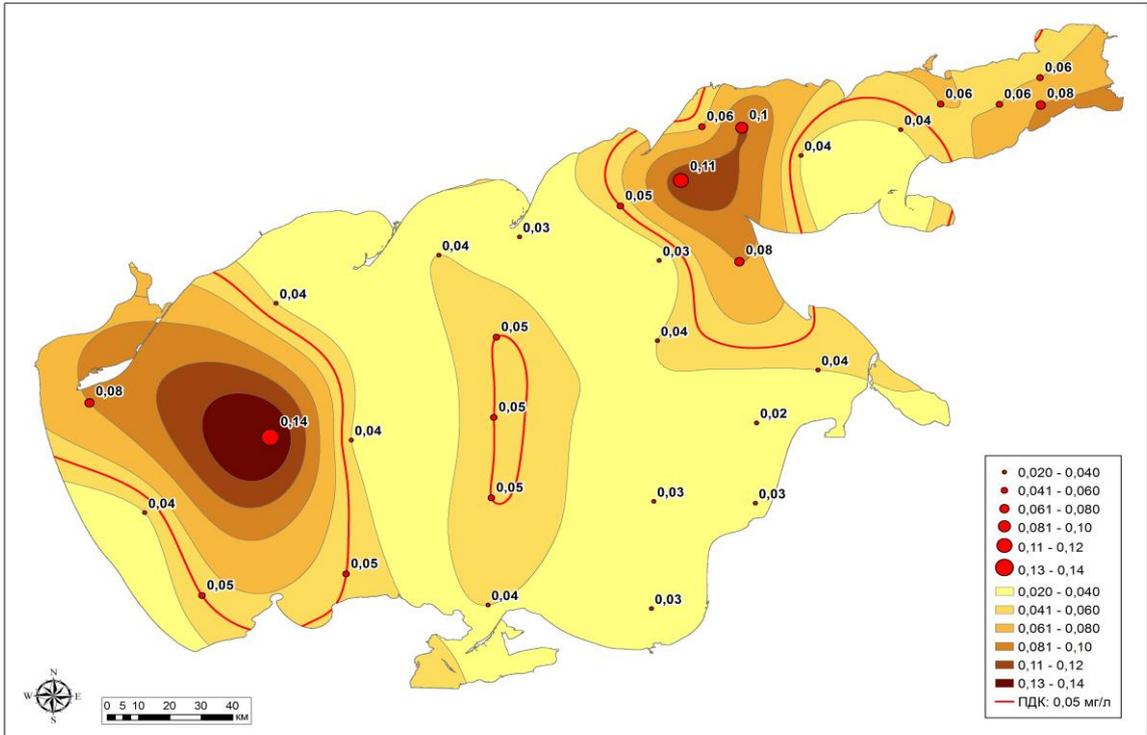


Рисунок 35 – Общее содержание углеводородов в акватории Азовского моря, летний период 2018 г.

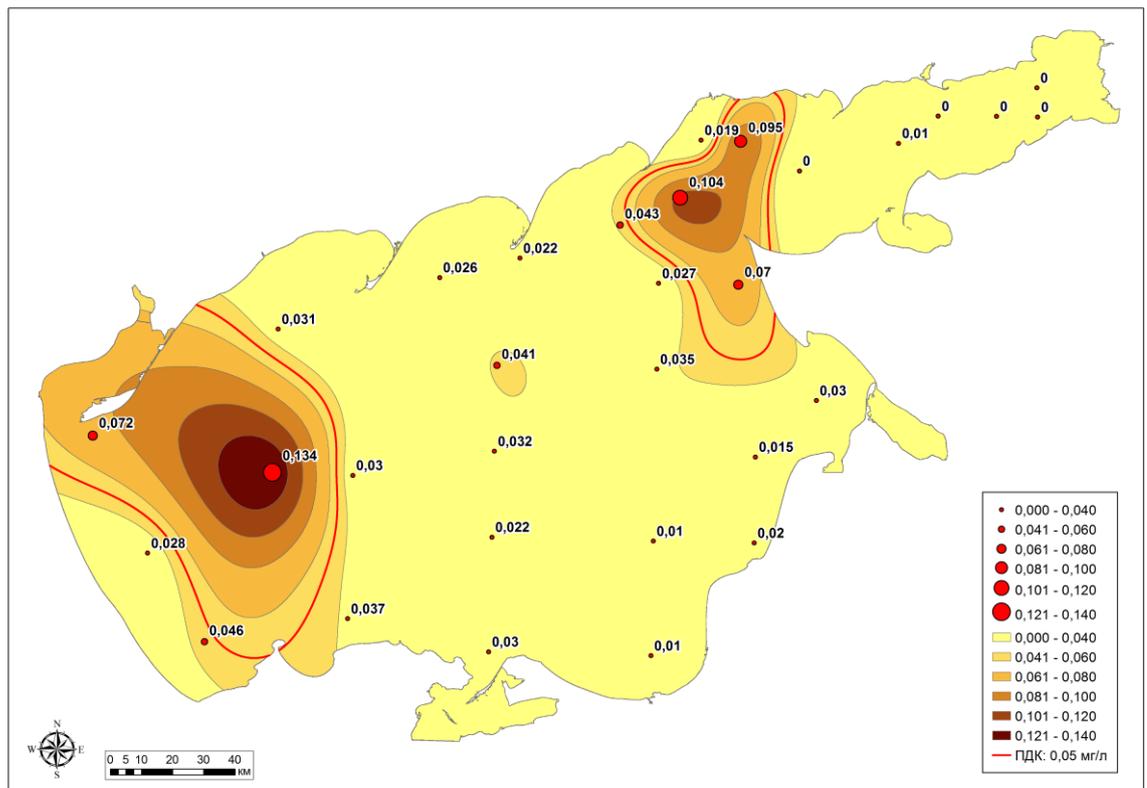


Рисунок 36 – Концентрации УВ в акватории Азовского моря за вычетом биогенного фона, летний период 2018 г.

В акватории Курчанского лимана в весенний период 2017-2018 гг., было выявлено преобладание сине-зеленых водорослей (*Snowella lacustris* (Chodat) Komárek & Hindák). Их процентное содержание в общей биомассе фитопланктона варьировало от 69 % до 92 %. Хроматограммы н-алканов характеризовались доминированием в низкомолекулярной области C₁₇. Содержание гептадекана от общей концентрации н-алканов составляло от 41% до 64 % (рисунки 37, 38).

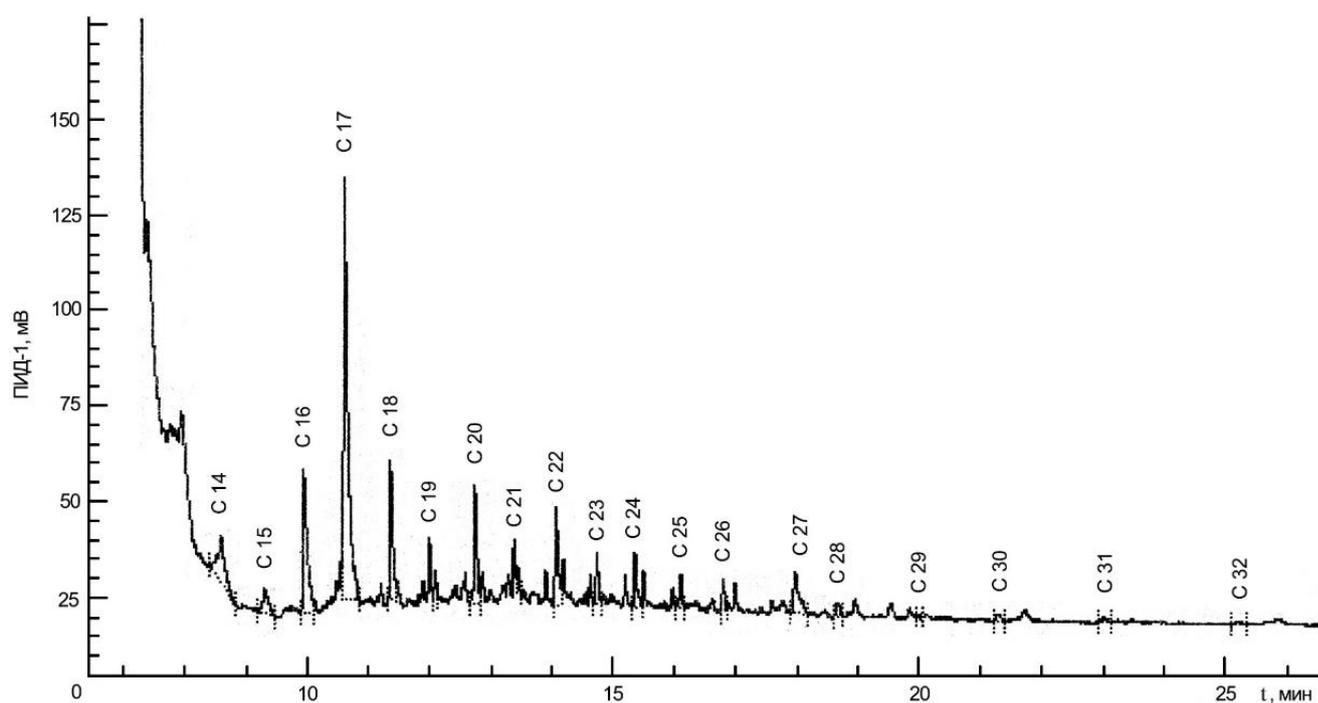


Рисунок 37 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из воды Курчанского лимана, май 2017 г.

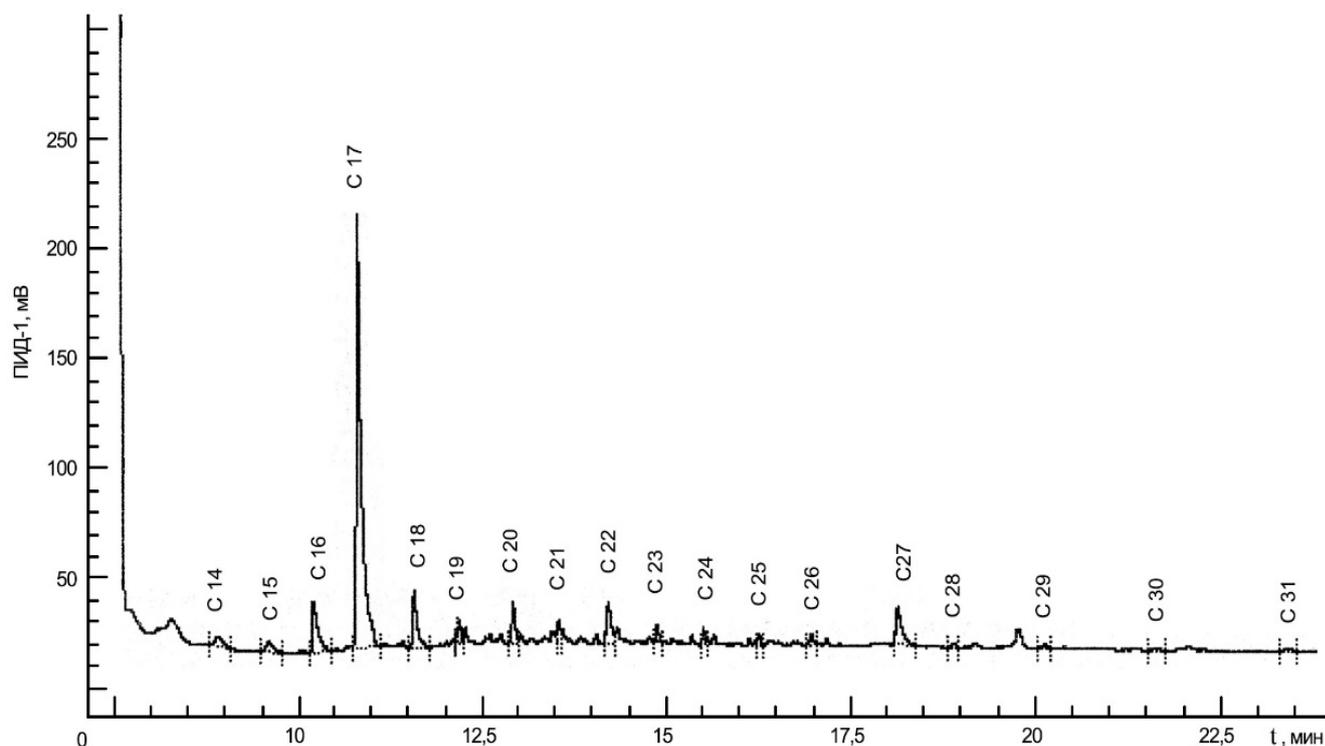


Рисунок 38 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из воды
Курчанского лимана, май 2018 г.

Установлено, что с увеличением биомассы сине-зеленых водорослей возрастает содержание гептадекана. При общей биомассе фитопланктона 20740 мг/м^3 , сине-зеленые водоросли составляли 19132 мг/м^3 , при этом концентрация н-алкана C_{17} составила 22.36 мг/дм^3 , суммарная концентрация углеводородов – 34.74 мг/дм^3 . С уменьшением биомассы сине-зеленых водорослей до 833 мг/м^3 при общей биомассе фитопланктона - 1042 мг/м^3 отмечено снижение концентрации гептадекана до 12.98 мг/дм^3 , при суммарной концентрации углеводородов – 31.65 мг/дм^3 .

В период массового цветения сине-зеленых водорослей в акватории Курчанского лимана, доля биогенных углеводородов варьировала от 70 % до 95 % от общей концентрации углеводородов (таблица 18).

Таблица 18 – Содержание УВ и хлорофилла "а" в общей биомассе фитопланктона в весенний период 2018 г в Курчанском лимане

| Место отбора | Концентрация хлорофилла "а", мг/м ³ | Биомасса фитопланктона, мг/м ³ | Концентрация, мг/дм ³ | | | Доля УВ _{био} , % |
|------------------|--|---|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| | | | ∑УВ | УВ _{био} | УВ _{неф} | |
| Курчанский лиман | 11.31 | 4524 | 0.035 | 0.027 | 0.008 | 77 |
| | 8.20 | 3280 | 0.020 | 0.019 | 0.001 | 95 |
| | 8.11 | 3244 | 0.020 | 0.019 | 0.001 | 95 |
| | 7.54 | 3016 | 0.020 | 0.018 | 0.002 | 90 |
| | 11.5 | 4600 | 0.031 | 0.028 | 0.003 | 90 |
| | 8.15 | 3260 | 0.020 | 0.019 | 0.001 | 95 |
| | 5.67 | 2268 | 0.020 | 0.014 | 0.006 | 70 |

Таким образом, для учета биогенных УВ возможно использовать данные о биомассе фитопланктона в исследуемых водных объектах. В период интенсивного цветения водорослей доля биогенных УВ в общей массе углеводов, может достигать 95 %.

Выводы

1. Рассмотрены основные методические особенности оценки нефтяного загрязнения водных экосистем, обусловленные сложностью состава нефти и нефтепродуктов и их трансформацией после поступления в водную среду. На примере анализа методик определения нефтепродуктов, допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга, и полученных экспериментальных данных проб воды Азовского моря рассмотрены области применимости различных методик определения нефтепродуктов в воде. Показано, что оценка уровня загрязнения водной экосистемы может значительно различаться в зависимости от используемой для регистрации оптической характеристики выделенных углеводородов и для получения более корректных данных предложено использовать комбинированный метод, включающий одновременное измерение интенсивностей люминесценции и поглощения в ИК-области спектра.

2. Проведена оценка уровня нефтяного загрязнения воды с учетом биогенного (природного) углеводородного фона исследуемых водных объектов. Анализ молекулярного состава парафиновых углеводородов в воде Азовского моря позволил выявить четыре основных типа распределения углеводородов в водной толще. Для количественного учета биогенных УВ в исследуемой водной экосистеме предложено использовать данные о биомассе фитопланктона и содержании в нем углеводородов, так как основными их продуцентами являются планктонные организмы.

3. Изучен качественный и количественный состав углеводородов, содержащихся в липидных фракциях массовых видов фитопланктона исследуемой водной экосистемы. Состав УВ, выделенных из разных видов фитопланктона, характеризуется для диатомовых (*Chaetoceros curvisetus* Cleve, *Phaeodactylum tricornutum*) и динофитовых (*Prorocentrum cordatum* (Ostenf.)) водорослей преобладанием C_{21} и наличием гомологического ряда с максимумами C_{29} и C_{31} , для зеленых (*Tetraselmis*) и сине-зеленых (*Synechococcus* sp. (BS 9001)),

Spirulina platensis) водорослей - преобладанием нечетных *n*-алканов C_{17} , C_{21} , C_{25} . В 1 мг фитопланктона концентрация УВ варьирует от 0.004 мг до 0.007 мг. Обоснован методический подход по оценке вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы по биомассе фитопланктона, рассчитываемой по концентрации в нем хлорофилла "а".

4. Для оценки вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы разработана экстракционно-флуоресцентная методика определения хлорофилла "а" в воде, позволяющая регистрировать концентрации пигмента в диапазоне от 0.1 мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в природных водах различной трофности. Разработанная методика (МИ 02067847.09-2018 «Массовая концентрация хлорофилла "а" в природных (пресных и морских) водах») включена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений - ФР.1.31.2019.33562.

5. Предложена унифицированная схема анализа вод для оценки уровня нефтяного загрязнения водных экосистем с учетом трансформации нефтяных компонентов и происхождения углеводородов различного генезиса, которая предусматривает дифференциацию нефтяных и биогенных углеводородов по содержанию в них хлорофилла "а". Предлагаемая схема оценки содержания биогенных углеводородов в пресных и морских водных объектах апробирована на водных объектах Азовского бассейна.

Список сокращений

- БОС – биогенные органические соединения
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ – газовая хроматография
ГХ/МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия
ЗВ – загрязняющие вещества
ИК - инфракрасный
КХ – колоночная хроматография
НП – нефтепродукты
НУ – нефтяные углеводороды
НК – нефтяные компоненты
ПАУ – полициклические ароматические углеводороды
ТСХ – тонкослойная хроматография
УВ – углеводороды
УФ – ультрафиолетовый

Список литературы

1. Постановление Правительства РФ от 9 августа 2013 г. № 681 (ред. от 30.11.2008) «О государственном экологическом мониторинге (государственном мониторинге окружающей среды) и государственном фонде данных государственного экологического мониторинга (государственного мониторинга окружающей среды)»
2. АМАР (Arctic Monitoring and Assessment Programme) // АМАР Assessment 2002: Persistent organic pollution in the Arctic. – Oslo: АМАР. – 2007. – 57 p.
3. NAS (National Academy of Sciences) // Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. National Research Council. – Washington, D.C.: The National Academies Press. – 2003. – 265 p.
4. Петров, А. А. Углеводороды нефти / А. А. Петров – Москва: Наука, 1984. – 263 с.
5. Карцев, А. А. Основы геохимии нефти и газа / А. А. Карцев – Москва: Недра, 1978. – 279 с.
6. Кормак, Д. Борьба с загрязнением моря нефтью и химическими веществами / Д. Кормак – Москва: Транспорт, 1989. – 376 с.
7. Ларин, А.А. Особенности определения и оценка накопления углеводородов в гидробионтах Азовского моря: дис. ... канд. хим. наук: 03.02.08 / Ларин Андрей Александрович. – Краснодар, 2010. – 132 с.
8. Эрих, В.Н. Химия нефти и газа / В.Н. Эрих – Москва: Химия, 1969. – 284 с.
9. Баженова, О. Геология и геохимия нефти и газа / О. Баженова, Ю. Бурлин, Б. Соколов, В. Хаин – Москва: Московский государственный университет, 2012. – 384 с.
10. Немировская, И. А. Углеводороды во взвеси и осадках различных районов российского сектора Черного моря / И. А. Немировская, В. Д. Онегина, Б. В. Коновалов // Морской гидрофизический журнал. – 2017. – № 4. – С. 48–60.

11. Harriman, B.H. Impact of Photooxidation and Biodegradation on the Fate of Oil Spilled during the Deepwater Horizon Incident: Advanced Stages of Weathering / B.H. Harriman, P. Zito, D.C. Podgorski, M.A. Tarr, J.M. Suflita // *Environmental Science and Technology*. –2017. –V. 51. –№. 13. – P. 7412–7421.
12. Patin, S.A. Oil and continental shelf ecology: in two volumes. 2nd edition revised and extended. V. 1: offshore oil and gas industry: present situation, prospects, factors of impact / S.A. Patin. – Moscow: Vniro publishing. – 2017. – 326 p.
13. Walker, D. Oil in the sea: Changes in the nature of sources and inputs since 1985/ D. Walker, K. Michel, J.C. Coleman, J. Michel // *Conference Paper. International Oil Spill Conference. IOSC*. – 2005. – P. 9830-9834.
14. Воробьев, Ю. Л. Предупреждение и ликвидация аварийных разливов нефти и нефтепродуктов / Ю. Л. Воробьев – Москва: Институт риска и безопасности, 2007.
15. Патин, С. А. Нефтяные разливы и их воздействие на морскую среду и биоресурсы / С. А. Патин – Москва: ВНИРО, 2008. – 508 с.
16. <http://planet.iitp.ru>
17. Зубков, М. М. Состояние минерально-сырьевой базы и прогноз нефтедобычи в Краснодарском крае / М. М. Зубков, А. И. Глумов, И. И. Евсюкова // *Нефть и газ юга России, Черного, Азовского и Каспийского морей*. – Геленджик : ГНЦ ФГУП «Южморгеология», 2006. – с. 53–57.
18. Кленкин, А.А. Экоаналитическая оценка состояния Азовского моря в многолетней динамике: дис. ... д-ра хим. наук: 03.00.16 / Клёнкин Анатолий Анатольевич. – Ростов-на-Дону, 2008. – 344 с.
19. Беляева, А. Н. Элементы преобразования липидов в океане: автореф. дис. ... канд. хим. Наук : 02.00.12 / Беляева Александра Николаевна. – М., 1974. – 28 с.
20. Миронов, О. Г. Нефтяное загрязнение и жизнь моря / О. Г. Миронов – Киев: Наукова думка, 1973. – 87 с.
21. AMAP (Arctic Monitoring and Assessment Programme) // *AMAP assessment report: Arctic pollution issues*. – Oslo: AMAP. –1998. – 859 p.

22. Степаньян, О.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на морфофункциональные особенности морских макроводорослей / О. В. Степаньян, Г. М. Воскобойников // Биология моря. – 2006. – Т. 32 – № 4. – С. 241 – 248.
23. Кожевин, П.А. Биотический компонент качества почвы и проблема устойчивости / П.А. Кожевин // Почвоведение. – 2001. – № 4. – С. 44 – 48.
24. Ambrose, Ph. Tarred loggerhead turtles / Ph. Ambrose // Mar Pollution Bull. –1994. – V. 28. – № 5. – P. 27
25. Миронов О.Г. Развитие водорослей макрофитов в условиях нефтяного загрязнения / О.Г. Миронов, И.М. Цымбал // Науч. докл. высш. школы. Биол. науки. – 1975. –№ 5. – С. 53–56.
26. Лурье Ю.Ю. О методах определения нефтепродуктов в сточных и природных водах / Ю.Ю. Лурье // Памятная записка о симпозиуме стран-членов СЭВ «Методы определения нефти и нефтепродуктов», (Применение сорбции и ионного обмена при анализе вод). – Москва, 1974. – 40 с.
27. Унифицированные методы исследования качества вод. Ч.1. Методы химического анализа вод. 3-е изд // Совещание руководителей водохозяйственных органов стран-членов СЭВ. – М: Изд. СЭВ. – 1977. – 830 с.
28. Dahl, M. Identification of Toxicants from a highly C₁₀-C₄₀ – Contaminated sediment influenced by the food industry: petroleum hydrocarbons or biogenic organic compounds?/ M. Dahl, S. Survo, P. Väitalo , G. Kabiersch, O.S. Alitalo , O.P. Penttinen , A.L. Rantalainen // Environ Toxicol Chem. – 2019. – V. 38. – P. 936-946.
29. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши // под ред. Семенова А.Д. Л.: Гидрометеиздат, 1977. – 541 с.
30. Руководство по методам химического анализа морских вод // под ред. Орадовского С.Г. Л.: Гидрометеиздат, 1977. – 208 с.
31. Cortes, J. E. Total petroleum hydrocarbons by gas chromatography in Colombian waters and soils / J. E. Cortes, A. Suspes, S. Roa, C. González, H.E. Castro // American Journal of Environmental Sciences. 2012. – V. 8. – № 4. – P. 396–402.
32. Okparanma, R.N. Determination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in soils: a review of spectroscopic and

nonspectroscopic techniques / R.N. Okparanma, A.M. Mouazen // *Applied Spectroscopy Reviews*. – 2013. – V. 48. – № 6. – P. 458–486.

33. Vershinin, V.I. Total indices as a tool to estimate sum content of similar analytes / V.I. Vershinin // *Talanta*. – 2015. – V. 131. – № 1. – P. 293–300.

34. Бродский, Е.С. Определение нефтепродуктов в объектах окружающей среды / Е.С. Бродский, С.А. Савчук // *Журнал аналитической химии*. – 1998. – Т. 53. – № 12. – С. 1238–1251.

35. Кленкин, А.А. Экосистема Азовского моря: антропогенное загрязнение/ А.А. Кленкин, И.Г. Корпакова, Л.Ф. Павленко, З.А. Темердашев – Краснодар, 2007. – 324 с.

36. Темердашев, З.А. О некоторых методических аспектах оценки нефтяного загрязнения водных объектов с учетом деградации нефтепродуктов во времени/ З.А. Темердашев Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова, Я.С. Ермакова, В.С. Экилик// *Аналитика и контроль*. – 2016. – Т. 20. – № 3. – С. 225-235.

37. Семенов, А.Д. Ускоренный люминесцентно-хроматографический метод определения нефтепродуктов в природных водах / А.Д. Семенов, А.Г. Страдомская, Л.Ф. Зурина // *Гигиена и санитария*. – 1970. – № 5. – С. 86-88.

38. Зурина, Л.Ф. Спектрофотометрический метод определения нефтепродуктов в воде / Л.Ф. Зурина, А.Г. Страдомская, А.Д. Семенов // *Гидрохимические материалы*. – 1973. – Т. 57. – С. 141–146.

39. Семенов, А.Д. Закономерности трансформации состава нефтепродуктов в водоемах и методология их контроля / А.Д. Семенов, А.Г. Страдомская, Л.Ф. Павленко // Тезисы докл. 2-го Международного Симпозиума по геохимии природных вод. – Ростов-на-Дону, 1982. – С.223 –224.

40. Божевольнов, Е.А. Люминесцентный анализ неорганических веществ/Е.А Божевольнов. – М.: Химия, 1966. – 415 с.

41. Беллами, Л. Инфракрасные спектры сложных молекул/ Л. Беллами. – М.: Изд. иностр. лит-ры, 1963. – 592 с.

42. Рао, Ч.Н.Р. Электронные спектры в химии. Пер. с англ./ Ч.Н.Р. Рао – М.: Мир, 1964. – 260 с.
43. ПНД Ф 14.1:2:4.128-98 Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах природных, питьевых, сточных вод флуорометрическим методом на анализаторе жидкости «ФЛЮОРАТ-02» (М01-05-2012) . – Москва, 1998 (изд. 2012 г.). – 24 с.
44. Simard, R.G. Infrared spectrometric determination of oil and phenol in water / R.G. Simard // *Anal. Chem.* – 1951. – № 23. – P. 1384–1389.
45. Вернадский, В.И. Проблемы биогеохимии / В.И. Вернадский. – М.: Наука, 1980. – 256 с.
46. Немировская, И.А. Углеводороды в океане (снег-лед-вода-взвесь-донные осадки) / И.А. Немировская. – М.: Научный Мир, 2004. – 328 с.
47. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment // International Maritime Organization. Reports and Studie. – London. – 1993. – № 50.
48. Пиковский, Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде / Ю.И. Пиковский – М.: МГУ, 1993. – 208 с.
49. Миронов, О.Г. Бактериальная трансформация нефтяных углеводородов в прибрежной зоне моря / О.Г. Миронов // *Морской экологический журнал.* – 2002. – Т. 1. – № 1. – С.56 – 66.
50. Yanto, D.H.Y. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007 / D.H.Y. Yanto, S. Tachibana // *International Biodeterioration & Biodegradation.* – 2013. – V. 85. – P. 438 – 450.
51. Muthukumar, A. Petroleum hydrocarbons (PHC) in sediments of three different ecosystems from Southeast Coast of India / A. Muthukumar, G. Idayachandiran, S. Kumaresan, T.A. Kumar, T. Balasubramanian // *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives.* – 2013. – V. 4. – № 3. – P. 543–549.
52. Венедиктова, О.И. Влияние физико-химических свойств донных осадков на сорбционную способность на примере водоемов Ленинградской

области / О.И. Венедиктова, О.Г. Роговая, И.Ю. Тихомирова // Научные ведомости. – 2017. – № 25. – С. 12–20.

53. Немировская И.А. Нефтяные углеводороды в океане / И.А. Немировская // Природа. – 2008. – № 3. – С. 17–27.

54. Spies, R.V. Ecology of a submarine petroleum seep off the California coast / R.V. Spies, P.H. Davis, D.H. Stuermer // Mar. Environm. Pol. – 1980. – V.1. – P. 229 – 263.

55. Дмитриевский, А.Н. Перспективы освоения нефтегазовых ресурсов российского шельфа / А.Н. Дмитриевский, М.Д. Белонин // Природа. – 2004. – № 9. – С.3–10.

56. Кошелева, В.А. Некоторые особенности распределения органического углерода в донных осадках арктического шельфа России / В.А. Кошелева // Изв. Русск. Геогр. Общ. – 2005. – Т.137. – № 6. – С.25–34.

57. Иванов, А.Ю. О нефтегазоносности и разгрузке подземных флюидов в южной части Каспийского моря по данным космической радиолокации / А.Ю. Иванов, Б.Н. Голубов, В.В. Затыгалова // Исследование Земли из космоса. – 2007. – № 2. – С. 62–81.

58. Затыгалова, В.В. О некоторых особенностях естественных выходов углеводорода в восточной части Азово-Черноморского бассейна / В.В. Затыгалова // Современные проблемы дистанционного зондирования Земли из космоса. – 2012. – Т.9. – № 4. – С. 194–201.

59. Скрыпник, Г.В. Углеводороды в экосистеме Азовского моря: дис. ... канд. хим. наук: 03.00.16 / Скрыпник Галина Васильевна. – Ростов-на-Дону, 2008. – 168 с.

60. Peters, K.E. The Biomarker Guide: Volume 2, Biomarkers and Isotopes in Petroleum Systems and Earth History/ K.E. Peters, C.C. Walters, J.W. Moldowan // Cambridge University Press; 2 edition, 2007. — 704 p.

61. Wang, Z. Forensic differentiation of biogenic organic compounds from petroleum hydrocarbons in biogenic and petrogenic compounds cross-contaminated soils and sediments /Z. Wang, C. Yang, F. Kelly-Hooper, B.P. Hollebone, X. Peng, C.E.

Brown, M. Landriault, J. Sun, Z. Yang // *Journal of Chromatography A.* – 2009. – V. 1216. – P. 1174–1191

62. Тиссо, Б. Образование и распределение нефти/ Б. Тиссо, Д. Вильте. – М.: Мир. Редакция литературы по вопросам геологических наук, 1981. – 504 с.

63. Ефремова, Т.А. Лабильные органические вещества (углеводы, липиды и белки) в Онежском озере / Т.А. Ефремова, А.В. Сабылина, П.А. Лозовик // *Труды Карельского научного центра РАН.* – 2013. – № 6 – С. 96–104.

64. Viron, C. Isolation and identification of unsaturated fatty acid methyl esters from marine micro_algal / C. Viron, A. Saunois., P. Andre [et al.] // *Analytical Chemicals Acta.* – 2000. – V. 409. – P. 257–266.

65. Басова, М.М. Жирнокислотный состав липидов микроводорослей: обзор / М.М. Басова. – Севастополь: ИнБЮМ НАНУ, 2003. – 34 с.

66. Соболева Е.В. Химия горючих ископаемых: Учебник/ Е.В. Соболева, А.Н. Гусева. – М.: Издательство Московского университета, 2010. – 312 с.

67. Виноградов, М.Е. Новые идеи в океанологии / М.Е. Виноградов, С.С. Лаппо. – Ин-т океанологии им. П. П. Ширшова. – М.: Наука, 2004. – 407 с.

68. Adeniji, A. O. Analytical Methods for the Determination of the Distribution of Total Petroleum Hydrocarbons in the Water and Sediment of Aquatic Systems: A Review/ A. O. Adeniji, O.O. Okoh, A.I. Okoh // *Journal of Chemistry.* – 2017. – 13 p.

69. Penkoa, L. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sea water of the GULF of Trieste(northern ADRIATIC) / Penkoa L., Bajtb O. // *Marine Pollution Bulletin.* – 2019. – V. 142. – P. 103–111.

70. Sakari, M. Urban effluent discharge into rivers; a forensic chemistry approach to evaluate the environmental deterioration / M. Sakari, L. S. Ting, L. Y. Houg et al.// *World Applied Sciences Journal.* –2012. – V. 20. – №. 9. – P. 1227–1235.

71. Rostami, S. Assessment of the toxicity, origin, biodegradation and weathering extent of petroleum hydrocarbons in surface sediments of Pars Special Economic Energy Zone, Persian Gulf / S. Rostami, O. Abessi, H. Amini-Rad // *Marine Pollution Bulletin.* – 2019. – Vol. 138. – P. 302 – 311.

72. Bouloubassi, I. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAN, LAB, PAH) / I. Bouloubassi, A. Saliot // *Oceanologica Acta*. – 1993. – V. 16. – №2. – P.145–161.
73. Багаева, Т.В. Синтез внеклеточных углеводов бактериями рода *Clostridium* / Т.В. Багаева, Е.Е. Зинурова, Е.И. Багаева // Тезисы Всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (МГУ имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, 21-24 декабря, 2005 г.). – М.: Макс – Пресс. – С.82 – 118.
74. Ladygina, N. A review on microbial synthesis of hydrocarbons/ N. Ladygina, E.G. Dedyukhina, M.B. Vainshtein // *ProcessBiochemistry*, 2006. – V. 41. – № 5. – P. 1001-1014.
75. Гусейнова, В. П. Пресноводные микроводоросли как источник внеклеточных соединений углеводородной природы / В. П. Гусейнова, А. В. Курейшевич // *Гидробиологический журнал*. – 2013. – Т. 49. – № 1. – С. 73–81.
76. Nikanorov, A.M. The role of biogenic hydrocarbons in the assessment of oil pollution of freshwater bodies / A.M. Nikanorov, A.G. Stradomskaya // *Water Resources*. – 2009. – V. 36. – № 1. – P. 61–67.
77. Adlard, E. R.. Identification of hydrocarbons pollutants on seas and beaches by gas chromatography / E.R. Adlard, L.F. Creaser, P.H.D. Matthews // *Anal. Chem.* – 1972. – V. 44. – № 1. – P. 64–73.
78. Matsumoto, G. Comparative study on organic constituents in pollution and unpolluted inland aquatic environments. 4. Indicators of hydrocarbons pollution for waters / G. Matsumoto // *J. Water Res.* – 1982. – V. 16. – № 11. – P. 1521–1527.
79. Бродский, Е. С. Идентификация нефтепродуктов в объектах окружающей среды с помощью газовой хроматографии и хромато-масс-спектрометрии / Е. С. Бродский, И.М. Лукашенко, Г.А. Калинкевич, С.А. Савчук // *Журнал аналитической химии*. – 2002. – Т. 57. – № 6. – С. 592–596.
80. Ehrhardt, M. The source identification of marine hydrocarbons by gas chromatography / M. Ehrhardt, M. Blumer // *Environ. Pollut.* – 1972. – V. 3. – P. 179–194.

81. Farrington, J. W. Intercalibration of analyses of recently biosynthesized hydrocarbons and petroleum hydrocarbons in marine lipids / J. W. Farrington, J. M. Teal, J. G. Oniunn, T. Wade, K. Burns // *Bull. Environ.* –1973. – V. 10. – № 3. – P. 129–136.

82. Миронов, О.Г. Мониторинг экологического состояния бухты Артиллерийская (Севастополь, Чёрное море) / О.Г. Миронов, С.В. Алёмов, Т.С. Осадчая, Е.В. Гусева, Т.О. Миронова, И.П. Муравьёва, О.А. Миронов, Л.В. Енинина, Д.А. Алифанова, Н.Г. Волков // *Морской экологический журнал.* – 2012. – Т.9. – № 1. – С. 41 – 52.

83. Kaiser, J. Lipid biomarkers in surface sediments from the Gulf of Genoa, Ligurian sea (NW Mediterranean sea) and their potential for the reconstruction of palaeo-environments/ J. Kaiser, N. Ruggieri, J. Hefter, H. Siegel, G. Mollenhauer, H.W. Arz, F.Lamy // *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers.* –2014. –V. 89. –P. 68-83.

84. Cabrerizo, A. Anthropogenic and biogenic hydrocarbons in soils and vegetation from the South Shetland Islands (Antarctica) / A. Cabrerizo, P. Tejedo, J. Dachs, J. Benayas // *Science of the Total Environment.* – 2016. –V. 569 –570. – P.1500–1509.

85. Бикбулатов, Э.С. Методологические и методические проблемы оценки нефтяного загрязнения в природных водах / Э.С. Бикбулатов, Ю.В. Ершов, Е.М. Бикбулатова, И.Э. Степанова // *Эколого-географические проблемы природопользования нефтегазовых регионов: Теория, методы, практика.* – Нижневартовск, 2003. – С. 108–121.

86. Павленко, Л.Ф. Особенности установления компонентного состава нефтяного загрязнения водных экосистем Азовского и Черного морей/ Л.Ф. Павленко, А.А. Ларин, И.А. Скороход, И.Г. Корпакова, З.А. Темердашев// *Экологический вестник научных центров ЧЭС.* – 2012. –№ 4. – С.76 –82.

87. Botello, A.V. Distribution of N-Paraffins in sea grasses, benthic algae, oysters and recent sediments from Terminos Lagoon, Campeche, Mexico / A.V.

Botello, E.F. Mandelli // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1978. – V. 19. – № 2. – P. 162–170.

88. Александров, С.В. Первичная продукция планктона в Вислинском и Куршском заливах Балтийского моря и ее связь с рыбопродуктивностью : дис. ... канд.биол.наук : 03.00.18 / Александров Сергей Валерьевич. — Санкт-Петербург, 2003. — 195 с.

89. Ведерников, В.И. Первичная продукция и хлорофилл в юго-восточной части Тихого океана / В.И. Ведерников, Е.Г. Стародубцев // *Тр. ИОАН*. –1971. –Т. 89. –С. 33–42.

90. Butterwick, C. A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae / C. Butterwick, S.I. Heaney, J.F. Talling // *Brit. Phycol. J.* – 1982. – V. 17. – № 1. – P. 69–79.

91. Бульон, В.В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. – Л.: Наука, 1983. – 150 с.

92. Jones, R.I. Light limitation of phytoplankton development in a oligotrophic lake Loch Ness, Scotland / R.I. Jones, J.M. Young, A.M. Hartley, A.E. Bailey-Watts // *Freshwat. Biol.* – 1996. – V. 35. – № 3. – P. 533–543.

93. Щур Л.А. Структура и функциональные характеристики бактерио- и фитопланктона в экосистемах водоемов разного типа : автореферат. дис. ... д-ра биолог.наук : 03.00.16/ Щур Людмила Александровна. – Красноярск, 2006. – 31 с.

94. Минеева, Н.М. Содержание хлорофилла *a* в единице биомассы фитопланктона водохранилищ Волжского каскада (РОССИЯ)/ Н.М. Минеева, Л.Г. Корнева, В.В. Соловьева // *Альгология*. – 2014. – Т. 24. – С. 477-478.

95. Минеева, Н.М. Содержание хлорофилла *a* в единице биомассы фитопланктона (Обзор) / Н.М. Минеева, Л.А. Щур // *Альгология*. — 2012. — Т. 22 — С. 441—456.

96. Ляшенко, О.А. Растительные пигменты как показатели биомассы фитопланктона в мелководном эвтрофном озере / О.А. Ляшенко // *Проблемы региональной экологии*. – 2004. – № 5. – С. 6–14.

97. Сиделев, С.И. Анализ связей пигментных и структурных характеристик фитопланктона высокоэвтрофного озера / С.И. Сиделев, О.В. Бабаназарова // Журн. Сибир. федерал. ун-та. – Сер. Биол. – 2008. – Т. 1. – № 2. – С. 162–177.
98. Wolfram, G. Reference conditions and WFD compliant class boundaries for phytoplankton biomass and chlorophyll a in Alpine lakes / G. Wolfram, C. Argillier, de J. Bortoli et al. // *Hydrobiologia*. – 2009. – V. 633. – № 1. – P. 45–58.
99. Михеева, Т.М. Оценка продукционных возможностей единицы биомассы фитопланктона / Т.М. Михеева. – Биологическая продуктивность эвтрофного озера. – М.: Наука, 1970. – С. 50–70.
100. Минеева, Н.М. Растительные пигменты в воде волжских водохранилищ / Н.М. Минеева. — Москва.: Наука, 2004. — 156 с.
101. Трифонова, И.С. Хлорофилл как мера биомассы фитопланктона в водоемах разного типа / И.С. Трифонова, Б. Десортова. – Гидробиологические процессы в водоемах. – Л.: Наука, 1983. – С. 58–80.
102. Адамович, Б.В. Связь содержания хлорофилла а с некоторыми характеристиками фитопланктона в рыбоводческих прудах и связанных с ними водотоках / Б.В. Адамович, А.А. Жукова // *Гидробиологический журнал*. — 2014. — Т. 50. — № 3. — С. 30–37.
103. Desortova, B. Relationship between chlorophyll-a concentration and phytoplankton biomass in several reservoir in Czechoslovakia / B. Desortova // *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* — 1981. — V. 66. — P. 153—169.
104. Felip, M. The relationship between phytoplankton biovolume and chlorophyll in a deep oligotrophic lake: decoupling in their spatial and temporal maxima / M. Felip, J. Catalan // *J. Plankton Res.* — 2000. — V. 22. — № 1. — P. 91—106.
105. Chetelat, J. Potamoplankton size structure and taxonomic composition: Influence of river size and nutrient concentrations / J. Chetelat, F.R. Pick, P.B. Hamilton // *Limnol. Oceanogr.* — 2006. — № 51. — P. 681—689.

106. Балашова, Н.Б. Водоросли / Н.Б. Балашова, В.Н. Никитина//— Л.: Лениздат. — 1989. — 92 с.
107. Рабинович, Ю. Роль хлорофилла в фотосинтезе / Ю. Рабинович, К. Говинджи // Молекулы и клетки. —1967. — № 2. — С. 72–83.
108. Weber, C.I. A review of methods for the analysis of chlorophyll in periphyton and plankton of marine and freshwater systems / C.I. Weber, L.A. Fay, G.B. Collins, D.E. Rathke, J. Tobin// Ohio State University Sea Grant Program Tech Bull. — 1986. — 54 p.
109. ISO 10260:1992 Water quality, measurement of biochem, parameters; spectrometric determination of the chlorophyll a concentration. Beuth Verlag GmbH. Berlin – Vien – Zurich.
110. РД 52.24.784-2013 Массовая концентрация хлорофилла "а". Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом. — ФГБУ «ГХИ». Ростов-на-Дону, 2013. —21 с.
111. ГОСТ 17.1.04.02.90 Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла «а». Государственный контроль качества воды. — М. Изд-во стандартов, 2001. — 688 с.
112. Iwamura, T. Improved methods for determining contents of chlorophyll, protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid in plankton populations / T. Iwamura, H. Nagai. S. Ichimura // Int. Revue ges. Hydrobiol. —1970. — № 55. — P. 131 —147.
113. Holm-Hansen, O. Chlorophyll a Determination: Improvements in Methodology / O. Holm-Hansen, B. Riemann // Oikos. —1978. —V. 30. — № 3. — P. 438-447.
114. Papisto, E. Chlorophyll a determination with ethanol – a critical test/ E. Papista, E. Acs, B. Boddill // Hydrobiologia. — 2002. — V. 485. —P. 191–198.
115. Huang, T.L. A new method for determination of chlorophylls in freshwater algae / T.L. Huang, H.B. Cong. // Environmental monitoring and assessment. —2007. — V. 129. — P. 1–7.

116. Qiu, N. A new method for fast extraction and determination of chlorophylls in natural water / N. Qiu, X. Wang, F. Zhou// *Zeitschrift fur Naturforschung*. –2017. – V. 73. – P. 1–10.
117. Qin, J.G. Optimization of the method for Chlorophyll extraction in Aquatic plants/ J.G. Qin, W. Yao, Y. Zhou, S. Su// *Journal of Freshwater Ecology*. – 2010. – V. 25. – P.531–538.
118. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза / А.Б.Рубин.– М.: Изд. Московского университета, 1975.– 224 с.
119. Aminot, A. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods / A. Aminot // *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. – 2000. – P. 1–17.
120. Jeffrey, S.W. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton / S.W. Jeffrey, G.F. Humphrey // *Biochem Physiol Pflanz*. – 1975. – V. 167. – P. 191–194.
121. Lorenzen, C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations / C.J. Lorenzen // *Limnology and Oceanography*. – 1967. – V. 12. – № 2. – P. 343–346.
122. Marker, A. F. H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin / A. F. H. Marker // *Freshwater Biology*. – 1972. –V. 2. – P. 361–385.
123. Parkin, T. Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake / T. Parkin, T. Brock // *Archiv fur Hydrobiologie*. – 1981. – V. 91. – P. 366–382.
124. Strickland, J. D. H. A Practical Handbook of Seawater Analysis / J. D. Strickland H., T.R. Parsons. – Ottawa : Bulletin Fisheries Research Board of Canada, 1968. – № 167. –311 p.
125. Richards, F.A. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments / F.A. Richards, T.G. Thompson // *J. Mar. Res.* – 1952. – V. 11. – P. 156–172.

126. Ritchie, R.J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in nature assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents/ R.J. Ritchie // *Photosynthetica*. –2008. – V. 46. – P. 115 – 126.
127. Ritchie, R.J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents / R.J. Ritchie // *Photosynthetica Research*. – 2006. –V. 89. –P. 27– 41.
128. Wright, S.W. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton / S. W. Wright, S. W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T.Bjornland, D.Repeta, N.Welschmeyer // *Marine ecology progress series*. – 1991. – V. 77. – P. 183-196.
129. Fietz, S. An HPLS analysis of the summer phytoplankton assemblage in Lake Baikal-Blackwell Publishing Ltd / S. Fietz, A. Nicklisch // *Freshwater biology*. – 2004. – V. 49. – P. 332 – 345.
130. Ediger, D. Estimation of phytoplankton biomass using HPLC pigment analysis in the southwestern Black Sea / D. Ediger, N. Soydemir, A.E. Kideys // *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. – 2006. – V. 53. – P. 1911–1922.
131. Maxwell, K. Chlorophyll fluorescence – a practical guide / K. Maxwell, N. Johnson // *Journal of Experimental Botany*. – 2000. –№ 345. – P. 659 – 668.
132. MacIntyre, H.L. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence / H.L. MacIntyre, E. Lawrenz, T.L. Richardson // *Chlorophyll fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications in Developments in Applications*. – 2010. – V. 4. – P. 129–169.
133. Ayeni, A.O. Validating chlorophyll-a concentrations in the Lagos Lagoon using remote sensing extraction and laboratory fluorometric methods / A.O. Ayeni, T.A. Adesalu // *MethodsX*. – 2018. – V. 5. – P. 1204–1212.
134. Pinto, A.M. Chlorophyll «a» determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development / A.M. Pinto, E. Von Sperling, R.M. Moreira // *Water Research*. – 2001. – V. 35. – P. 3977–3981.

135. Povazhnyi, V.V. Determination of the chlorophyll "a" concentration using a combined method based on measurements with a modified photometer / V.V. Povazhnyi // *Oceanology*. – 2012. – V. 52. – № 4. – P. 561–565.
136. Povazhnyi, V.V. A fluorometer on the basis of powerful light emitting diodes for determination of the chlorophyll "a" concentration / V.V. Povazhnyi // *Oceanology*. – 2014. – V. 54. – № 3. – P. 387–391.
137. Шавыкин, А.А. Непрерывные измерения океанологических параметров в приповерхностном слое Таганрогского залива. Определение хлорофилла «а» флуориметрическим методом / А.А. Шавыкин, С.В. Бердников, В.В. Сапрыгин, Р.Е. Вербицкий // *Вестник Южного Научного центра РАН*. – 2010. – Т. 6. – № 3. – С. 39 – 48.
138. Friedrichs, A. SmartFluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chlorophyll a Fluorescence with Smartphones / A. Friedrichs, J.A. Busch, H.J.V. Woerd, O. Zielinski // *Sensors*. – 2017. – V.17. – № 4. – P. 1–14.
139. Heim, B. Variation in Lake Baikal's phytoplankton distribution and fluvial input assessed by SeaWiFS satellite data / B. Heim, H. Oberhaensli, S. Fietz, H. Kaufmann // *Glob. Change Biol.* – 2005. – V.46. – P. 9–27.
140. Суслин, В.В. Региональный алгоритм расчета концентрации хлорофилла "a" в Черном море по спутниковым данным SeaWIFS / В.В. Суслин, Т.Я. Чурилова, Х.М. Сосик // *Морской экологический журнал*. – 2008. – Т. 7. – № 2. – С. 24 – 42.
141. Sayers, M.J. A new method to generate a high-resolution global distribution map of lake chlorophyll / M.J. Sayers // *International Journal of Remote Sensing*. 2015. – V. 36. – № 7. – P. 1942 – 1964
142. Сапрыгин, В.В. Пространственное распределение и сезонная динамика концентрации хлорофилла "а" в Азовском море по данным спутниковых снимков спектрометра MERIS/ В. В. Сапрыгин, С. В. Бердников, В. В. Кулыгин, Л. В. Дашкевич, Л. М. Местецкий. // *Океанология*. – 2018. – Т. 58. – № 5. – С. 689– 699.

143. Кульчин, Ю.Н. Комплексный контроль состояния морских акваторий оптическими методами. Часть 4. Оптоволоконная система измерения концентрации фитопланктона/ Ю.Н. Кульчин, С.С. Вознесенский, Е.Л. Гамаюнов, А.А. Коротенко, А.Ю. Попик, А.Ю. Майор// Оптика атмосферы и океана. – 2013. – Т. 26. – № 6. – С. 40 – 45.

144. Watanabe, F. Estimation of Chlorophyll-a Concentration and the Trophic State of the Barra Bonita Hydroelectric Reservoir Using OLI/Landsat-8 Images /F. Watanabe, E. Alcantara, T. Rodrigues, N. Imai, C. Barbosa, L. Rotta // International journal of environmental research and public health. – 2015. – № 12. – P. 10391–10417.

145. Чурилова, Т.Я. Поглощение света и максимальный квантовый выход фотосинтеза в период осеннего цветения фитопланктона в Черном море / Т.Я. Чурилова, З.З. Финенко, С. Тургул // Морской экологический журнал. – 2008. – Т. 7. – № 3. – С. 75– 86.

146. Demidov, A.B. Seasonal dynamics and estimation of the annual primary production of phytoplankton in the Black sea / A. B. Demidov // Oceanology. – 2008. – V. 48. – № 5. – P. 664 – 678.

147. Neveux, J. Comparison of chlorophyll and phaeopigment determinations by spectrophotometric, fluorometric, spectrofluorometric and HPLC methods / J. Neveux, D. Delmas, J.C. Romano, P. Algarra, L. Ignatiades, A. Herbland, P. Morand, A. Neori, D. Bonin, J. Barbe, A. Sukenik// Marine Microbial Food Webs. – 1990. – V. 4. – P. 217–238.

148. Matthews, M.W. An algorithm for detecting trophic status (chlorophyll-a), cyanobacterial-dominance, surface scums and floating vegetation in inland and coastal waters / M.W. Matthews, S. Bernard, L. Robertson // Remote Sens. Environ. – 2012. – V. 124. – P. 637 – 652.

149. Matsushita, B. A hybrid algorithm for estimating the chlorophyll-a concentration across different trophic states in Asian inland waters / B. Matsushita, G. Yu, W. Yang, Y. Oyama // ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing. – 2015. – V. 102. – P. 28 – 37.

150. Picazo, A. Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: a critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake /A. Picazo, C. Rochera, E. Vicente, M.R. Miracle, A. Comacho// *Limnetica*. – 2013. – V. 32. – № 1. – P. 139–158.
151. Matthews, M.W. Bio-optical modeling of phytoplankton Chlorophyll – a / *Bio-optical Modeling and Remote Sensing of Inland Waters*/ M.W. Matthews // Elsevier. – 2017. – P. 157–188.
152. Brocks, J.J. Sedimentary hydrocarbons, biomarkers for early life / J.J. Brocks, R E. Summons // *Treatise on geochemistry. Biogeochemistry*. Amst.; Boston. – 2004. – V. 8. – P. 63–115.
153. Blumer, M. Hydrocarbons of marine phytoplankton / M. Blumer, R.R.L. Guillard, T. Chase // *Marine Biology*. – 1971. – V. 8. – № 3. – P. 183–189.
154. Гаретова, Л.А. Биогенные углеводороды и их влияние на оценку нефтяного загрязнения (на примере устьевой области реки Токи, Хабаровский край)/ Л.А. Гаретова// *Чтения памяти В.Я. Леванидова*. – 2014. – № 6. – С. 152–158.
155. Nishimura, M. Possible origin of n-alkanes with remarkable even-to-odd predominance in recent marine sediments / M. Nishimura, E.W. Baker // *Geochim. Cosmochim. Acta*. – 1986. – V. 50. – №. 2. – P. 299–305.
156. Belyaeva, A.N. Lipid biomarker accumulation in the Kara Sea sediments / A.N. Belyaeva, G. Eglinton // *Oceanology*. –1997. –V. 37. – № 5. –P. 634 – 642.
157. Хант, Дж. Геохимия и геология нефти и газа / Дж. Хант – М.: Книга по Требованию, 2013. – 704 с.
158. Dembicki, H. Possible Ecological and Environmental Significance of the Predominance of Even Carbon Number C_{20} - C_{30} n-alkanes /H.Dembicki, W.G.Meinschein, D.E.Hattin // *Geochim. Cosmochim. Acta*.–1976.–№ 2. – P. 205– 208.
159. Немировская, И.А. Особенности распределения углеводородов в Юго-восточной части Балтийского моря / И.А. Немировская, В.В. Сивков // *Океанология*. – 2012. – Т.52. – №1. – С. 40–53.

160. Немировская, И.А. Особенности распределения углеводов в дельте Северной Двины во время половодья / И.А. Немировская // Геохимия. – № 8. –2011. – С. 863–874.
161. Миронов, О. Г. Потоки нефтяных углеводов через морские организмы/ О.Г. Миронов// Морской экологический журнал. – 2006. – Т. 5. – № 2. – С. 5–14.
162. Миронов, О.А. Нефтяные углеводороды в массовых организмах зарослевых сообществ прибрежной зоны Севастополя (Чёрное море): автореф. ... канд. биол. наук : 03.02.10 / Миронов Олег Андреевич . – 2014. – 24 с.
163. Барашков, Г. В. Химия водорослей/ Г. В. Барашков. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 142 с.
164. Dahmen, J.L. Structural Analysis and Cellular Localization of Polyunsaturated C27 Hydrocarbons in the Marine Dinoflagellate, *Pyrocystis lunula* (Dinophyceae) / Jeremy L. Dahmen, Jeffrey D. Leblond // *Protist*. — 2013. —V. 164. — P. 183–194.
165. Миронов, О.Г. Углеводороды в морских организмах / О.Г. Миронов, Т.Л. Щекатурина // *Гидробиол. журн.* – 1976. – Т. 12. –№ 6. –С. 5–14.
166. Hunt, J.M. Petroleum geochemistry and geology/ J.M. Hunt. — San Francisco : W.H. Freeman and Company, 1979. — 617 p.
167. Garetova, L.A. Hydrocarbons in a lagoon estuary of the Tatar Strait / L.A. Garetova // *Izv. TINRO*. — 2013. — V. 172. — P. 196–207.
168. Corner, E.D. Pollution studies with marine plankton. Part 1. / E.D. Corner // *Advances in marine biology*. – 1978. – V.15. – P. 289–380.
169. Clark, R.C.J. Distribution of n-paraffin's in marine organisms and sediment / R.C.J. Clark, M. Blumer // *Limnology and Oceanography*. – 1967. – V.12. – P. 79-87.
170. Kashiya, Y. Evidence of global chlorophyll d / Y. Kashiya H. Miyashita S. Ohkubo N. O. Ogawa Y. Chikaraishi Y. Takano H. Suga T. Toyofuku H. Nomak// *Science*. — 2008. — V. 321. — № 5889. — P. 658 — 668.
171. Akiyama, M. Detection of chlorophyll d' and pheophytin a in a chlorophyll d-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*// M. Akiyama,

H. Miyashita, H. Kise, T. Watanabe, S. Miyachi, M. Kobayashi// *Analytical Sciences*. — 2001. — V. 17. — № 1. — P. 205—208.

172. Kume, A. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? / A. Kume, T. Akitsu, K.N. Nasahara// *Journal of Plant research*. — 2018. — V. 131. — № 6. — P. 961—972.

173. Корнеев, Д.Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла/ Д.Ю. Корнеев. — К.: Альтерпрес, 2002. — 191 с.

174. ФР.1.31.2019.33562. Массовая концентрация хлорофилла "a" в природных (пресных и морских) водах. Методика измерений люминесцентным методом. —ФГБОУ ВО КубГУ, 2018. — 13 с.

175. Harrison, P.J. Cell volumes of marine phytoplankton from globally distributed coastal data sets/ P.J. Harrison, A. Zingone, M.J. Mickelson, S. Lehtinen, N. Ramaiah, A. Kraberg, J. Sun, A. McQuatters-Gollop, H.H. Jakobsen// *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. — 2015. —V. 162. — P. 130 – 142.

176. Olli, K. Diversity of coastal phytoplankton assemblages – cross ecosystem comparison/ K. Olli, H.M. Paerl, R. Klais // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. — 2015. —V. 162. — P. 110 – 118.

177. Винберг, Г.Г. Первичная продукция водоемов. – Минск: Изд-во АН БССР, 1960. – 330 с.

Приложение

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Кубанский государственный университет»
(ФГБОУ ВО КубГУ)

**МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА «а»
В ПРИРОДНЫХ (ПРЕСНЫХ И МОРСКИХ) ВОДАХ.
Методика измерений люминесцентным методом**

Краснодар
2018

МИ 02067847.09-2018

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Кубанский государственный университет» (ФГБОУ ВО КубГУ)

2 РАЗРАБОТЧИКИ З.А. Темердашев, д-р хим. наук; И.Г. Корпакова, д-р биол. наук; Л.Ф. Павленко, к.х.н., Я.С. Ермакова

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом ректора ФГБОУ ВО «КубГУ» от 30.01.2019 № 104

4 МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ АТТЕСТОВАНА ФГБУ «ГХИ»
Свидетельство об аттестации
№ С.43.МИ 02067847.09.РА.РУ.311345-2018 от 20.12.2018

Содержание

| | |
|---|----|
| 1 Область применения | 1 |
| 2 Нормативные ссылки | 1 |
| 3 Требования к показателям точности измерений | 2 |
| 4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, реактивам, материалам | 2 |
| 4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства | 2 |
| 4.2 Реактивы и материалы | 4 |
| 5 Метод измерений | 4 |
| 6 Требования безопасности, охраны окружающей среды | 4 |
| 7 Требования к квалификации оператора | 4 |
| 8 Отбор и хранение проб | 5 |
| 9 Условия выполнения измерений | 5 |
| 10 Подготовка к выполнению измерений | 5 |
| 10.1 Приготовление растворов и реактивов | 5 |
| 10.5 Подготовка ваты | 7 |
| 10.6 Подготовка посуды | 7 |
| 10.7 Подготовка измерительной аппаратуры | 7 |
| 10.8 Контроль стабильности градуировочной характеристики | 8 |
| 11 Выполнение измерений | 8 |
| 11.1 Экстракция хлорофилла «а» из воды | 8 |
| 11.2 Выполнение измерений | 9 |
| 11.3 Холостое определение | 9 |
| 12 Вычисление и оформление результатов измерений | 9 |
| 12.1 Вычисление результатов измерений | 9 |
| 12.2 Оформление результатов измерений | 10 |
| 13 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории | 10 |
| 13.1 Общие положения | 10 |
| 13.2 Алгоритм контроля повторяемости (для двух измерений с использованием рабочих проб) | 11 |
| 14 Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости | 11 |

МИ 02067847.09-2018

Введение

При оценке экологического состояния водных объектов большое внимание уделяется фитопланктону - основному продуценту первичного органического вещества. В состав фотосистем, участвующих в фотосинтезе органического вещества, входят различные пигменты. Среди всего комплекса пигментов фотохимически активен хлорофилл «а», остальные имеют вспомогательное значение. Хлорофилл «а», как основной пигмент, обеспечивающий фотохимические восстановительные реакции, присутствует во всех видах фотосинтезирующих водорослей.

Количество хлорофилла «а» чаще всего определяют спектрофотометрическим методом в соответствии с ГОСТ 17.1.04.02-90. При анализе природных вод с низким содержанием хлорофилла «а» этот метод допускает существенные ошибки и требует большого объема анализируемых проб воды. Поэтому для определения хлорофилла «а» в водоемах с низкой продуктивностью целесообразно использовать более чувствительный люминесцентный метод. Разработаны люминесцентные методы определения хлорофилла «а» с использованием погружных датчиков. Использование проточного или погружного флуориметров позволяет проводить измерения содержания хлорофилла «а» по ходу судна и вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени. Однако не все лаборатории, занимающиеся оценкой состояния водных объектов, располагают необходимым для этого оборудованием.

Настоящая методика измерений хлорофилла «а» люминесцентным методом предусматривает определение его по интенсивности люминесценции хлороформного экстракта природных (пресных и морских) вод.

**МАССОВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА «а»
В ПРИРОДНЫХ (ПРЕСНЫХ И МОРСКИХ) ВОДАХ.
Методика измерений люминесцентным методом**

Дата введения – 2018 – 01 – 30

1 Область применения

1.1 Настоящий документ устанавливает методику измерений массовой концентрации хлорофилла «а» в природных (пресных и морских) водах по измерению интенсивности люминесценции полученного экстракта хлорофилла «а». Диапазон измеряемых массовых концентраций хлорофилла «а» от 0,1 мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в природных водах различной трофности: от ультраолиготрофных до гипертрофных вод (свыше 200 мкг/дм³).

1.2 Настоящий документ предназначен для использования в лабораториях, осуществляющих анализ природных (пресных и морских), вод.

2 Нормативные ссылки

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.

ГН-2.2.5.1313-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны».

ГОСТ 31861-2012 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике.

МИ 2881-2004 Рекомендация. ГСИ. Методики количественного химического анализа. Процедуры проверки приемлемости результатов анализа.

РМГ 76-2004 ГСИ. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

Примечания

1. Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделе 4.

2. При пользовании настоящим руководящим документом целесообразно проверять действие национальных стандартов – в информационной системе общего пользования – на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 янва-

МИ 02067847.09-2018

ря текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году.

3. Если ссылочный нормативный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящим руководящим документом следует руководствоваться замененным (измененным) нормативным документом. Если ссылочный нормативный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Требования к показателям точности измерений

3.1 При соблюдении всех регламентируемых методикой условий проведения измерений характеристики погрешности результата измерения с вероятностью 0,95 не должны превышать значений, приведенных в таблице 1.

3.2 Значения показателя точности методики используют при:

- оформлению результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке деятельности лабораторий на качество проведения испытаний;
- оценке возможности использования результатов измерений при реализации методики выполнения измерений в конкретной лаборатории.

Таблица 1 – Диапазон измерений, значения показателей повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности, при принятой вероятности 0,95

| Диапазон измерений массовой концентрации хлорофилла «а», мкг/дм ³ | Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), σ_r , % | Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R , % | Показатель правильности (границы систематической погрешности), Δ_c , % | Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm\delta$, % |
|--|--|--|---|--|
| От 0,1 до 0,25 включ. | 4 | 5 | 5 | 14 |
| Св. 0,25 до 5,0 включ. | 2 | 5 | 3 | 11 |

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, реактивам, материалам

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

4.1.1 Спектрофлуориметр RF-5301 PC («Shimadzu», Япония), спектрофлуориметр RF-510 («Shimadzu», Япония) или другой с аналогичными характеристиками.

4.1.2 Колба мерная 2 класса точности исполнения 4 по ГОСТ 1770-74 вместимостью 100 см³ – 1 шт.

4.1.3 Микрошприц 705N PST3 500 мкл 80565 («Hamilton», США), погрешность 0,05 мкл – 1 шт.

4.1.4 Пробирки градуированные исполнения 2 с притертыми стеклянными пробками по ГОСТ 1770-74 вместимостью 10 см³ с ценой деления 0,1 см³ – 6 шт.

4.1.5 Пробирки градуированные исполнения 2 с притертыми стеклянными пробками по ГОСТ 1770-74 вместимостью 25 см³ с ценой деления 0,2 см³ – 6 шт.

4.1.6 Пипетки вместимостью 5 см³ по ГОСТ 29227-91 с ценой деления 0,05 см³ – 5 шт.

4.1.7 Воронки делительные ВД исполнения 3, ХС, по ГОСТ 25336-82 вместимостью:

100 см³ – 3 шт., 250 см³ – 3 шт., 500 см³ – 3 шт., 1000 см³ – 3 шт.

4.1.8 Воронки лабораторные по ГОСТ 25336-82 диаметром 25-36 мм – 3 шт.

4.1.9 Механический встряхиватель лабораторный типа АБУ–6с.

4.1.10 Шкаф универсальный вытяжной ШУВ-1 по ТУ 10-23-242-86.

4.1.11 Шкаф сушильный общелабораторного назначения.

4.1.12 Электроплитка с закрытой спиралью по ГОСТ 14919-83.

4.1.13 Насадка, тип НЭТ (для аппарата Сокслета объемом 250 см³).

4.1.14 Установка из стекла для перегонки растворителей (круглодонная колба типа К-1 с взаимозаменяемым конусом 29/32, ТС, вместимостью 1 дм³, елочный дефлегматор длиной не менее 350 мм со взаимозаменяемыми конусами 19/26 и 29/32, насадка Н1 с взаимозаменяемыми конусами 19/26-14/23, холодильник типа ХПТ-1 длиной не менее 30 см с взаимозаменяемыми конусами 14/23, аллонж АИ -14/23) по ГОСТ 25336-82, термометр лабораторный по ГОСТ 29224-91 с диапазоном измерения температур от 0 °С до 100 °С и ценой деления не более 0,5 °С.

4.1.15 Дистиллятор Д-1, МРТУ-42.

4.1.16 Флаконы стеклянные с притертыми пробками для хранения растворов и экстрактов вместимостью 20 см³, 50 см³ и 100 см³.

4.1.17 Посуда из темного стекла с притертыми или корковыми или пластиковыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и двойным слоем тефлоновой пленки для отбора проб воды вместимостью 100 см³, 250 см³, 500 см³, 1000 см³.

4.1.18 Батометр Молчанова или Ван-Дорна.

4.1.19 Холодильник бытовой.

Примечание - Допускается использование других типов средств измерений, посуды и вспомогательного оборудования, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в 4.1.

МИ 02067847.09-2018

4.2 Реактивы и материалы

4.2.1 CHLOROPHYLL A FROM SPINACH фирмы SIGMA-ALDRICH «С5753-1 мг».

4.2.2 Хлороформ по ТУ 6-09-4263-76, или ТУ 2631-066-444931179-01, х.ч.

4.2.3 Серная кислота концентрированная по ГОСТ 4204-77, х.ч.

4.2.4 Натрий серноокислый, безводный по ГОСТ 4166-76, ч.

4.2.5 Калий двуххромовокислый по ГОСТ 4220-75, х.ч.

4.2.6 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

4.2.7 Вата медицинская по ГОСТ 5556-81.

Примечание – Допускается использование реактивов, изготовленных по другой нормативной и технической документации, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в 4.2.

5 Метод измерений

Методика определения хлорофилла «а» основана на выделении его из природных (пресных и морских) вод экстракцией хлороформом и измерении интенсивности люминесценции экстракта при $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм. Количество хлорофилла «а» определяют по градуировочному графику, построенному по стандартному образцу хлорофилла «а».

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

6.1 По степени воздействия на организм применяемые реактивы относятся к 1 и 2 классам опасности по ГОСТ 12.1.007.

6.2 Лаборатория, в которой проводится подготовка проб, должна быть оборудована приточно-вытяжной вентиляцией и средствами пожаротушения.

6.3 Операторы должны быть проинструктированы о мерах предосторожности при работе с концентрированной серной кислотой, хлороформом.

6.4 Операторы должны быть проинструктированы о мерах предосторожности работы с ультрафиолетовым излучением, обеспечены защитной одеждой (халат, перчатки).

6.5 Отходы использованных реактивов следует собирать в специальные ёмкости для утилизации.

7 Требования к квалификации оператора

Подготовительные работы к анализу может выполнять лаборант, имеющий опыт работы в химических лабораториях не менее 1 года. Определение и расчет количественного содержания хлорофилла может

выполнять квалифицированный специалист-химик, имеющий специальное образование, прошедший соответствующий инструктаж, владеющий теорией и практикой (не менее 1 года) спектрометрического анализа.

8 Отбор и хранение проб

Отбор проб воды проводят в соответствии с ГОСТ 31861-2012. Отбор проб воды осуществляют с помощью батометра (типа Молчанова или Ван-Дорна) в стеклянные бутылки из темного стекла с притертыми или полиэтиленовыми, обернутыми фольгой пробками вместимостью 100-1000 см³. В пробу воды непосредственно после отбора добавляют 20 см³ хлороформа и энергично в течение 2-3 мин встряхивают. Пробы хранят в темном прохладном месте не более 1 месяца. Объем пробы воды зависит от трофности водоема и может варьировать от 100 до 1000 см³:

| Концентрация хлорофилла «а», мкг/дм ³ | Объем пробы, дм ³ |
|--|------------------------------|
| От 0,1 до 5 включ. | 1000 |
| Св. 5 – 50 включ. | 500 |
| Св. 50 включ. | 100 |

9 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура окружающего воздуха, °С 22 ± 5;
- атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.).....от 84,0 до 106,7
(от 630 до 800);
- влажность воздуха при температуре 25 °С, %, не более 80;
- напряжение в сети, В 220 ± 22;
- частота переменного тока в сети питания, Гц 50 ± 1.

10 Подготовка к выполнению измерений

10.1 Приготовление растворов и реактивов

10.1.1 Приготовление стандартного раствора хлорофилла «а»

Стандартный раствор с массовой концентрацией хлорофилла «а» 10 мкг/см³ готовят из стандарта «С5753-1 мг», содержащего 1 мг хлорофилла «а». Содержимое вскрытой ампулы количественно переносят в мерную колбу, вместимостью 100 см³, оmyвая внутреннюю поверхность ампулы хлороформом с помощью шприца. Доводят раствор в колбе до метки хлороформом и перемешивают. Полученный раствор хранят обернутым плотной черной бумагой в холодильнике.

МИ 02067847.09-2018

10.1.2 Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией 200 нг/см³

Микрошприцем вместимостью 500 мкл отбирают 200 мкл основного раствора с массовой концентрацией 10 мкг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.1.3 Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией 100 нг/см³

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 5 см³ отбирают 5 см³ раствора с массовой концентрацией 200 нг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.1.4 Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией 50 нг/см³

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 5 см³ отбирают 5 см³ раствора с массовой концентрацией 100 нг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.1.5 Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией 25 нг/см³

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 5 см³ отбирают 5 см³ раствора с массовой концентрацией 50 нг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.1.6 Приготовление градуировочного раствора с массовой концентрацией 10 нг/см³

Градуированной пипеткой вместимостью 5 см³ отбирают 4 см³ раствора с массовой концентрацией 25 нг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.1.7 Градуировочный раствор с массовой концентрацией 5 нг/см³

Пипеткой с одной отметкой вместимостью 5 см³ отбирают 5 см³ раствора с концентрацией 10 нг/см³, вносят в градуированную пробирку вместимостью 10 см³ и доводят до метки хлороформом.

10.2 Построение градуировочного графика

Измеряют интенсивность люминесценции градуировочных растворов при $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см^3 . По полученным данным строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию хлорофилла «а» (нг/см^3), а по оси ординат - интенсивность люминесценции. Устанавливают вид градуировочной характеристики (коэффициент градуировки) с помощью компьютерной программы (Excel).

10.3 Очистка хлороформа

Для удаления примесей хлороформ перегоняют, отбирая фракцию с температурой кипения $61,2$ °С. Критерием чистоты хлороформа является отсутствие люминесценции при $\lambda_{\text{возб}} = 400-420$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 600-700$ нм. Проверяют чистоту каждой партии хлороформа. Хранят в склянке из темного стекла и в темном месте не более 1 мес.

10.4 Подготовка сульфата натрия

Сернистый натрий перед употреблением высушивают при температуре от 105 °С до 110 °С в течение 8 часов. Хранят в эксикаторе.

10.5 Подготовка ваты

Вату промывают хлороформом в аппарате Сокслета в течение 14 ч, сушат на воздухе, хранят в эксикаторе.

10.6 Подготовка посуды

Посуду, используемую при отборе и анализе проб тщательно моют хромовой смесью, несколько раз ополаскивают сначала водопроводной, затем дистиллированной водой. Посуду сушат в сушильном шкафу. Сухую охлажденную посуду ополаскивают 3-4 раза хлороформом. Посуда считается чистой, если хлороформ, которым ополаскивали посуду, не люминесцирует при $\lambda_{\text{возб}} = 400-420$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 600-700$ нм.

10.7 Подготовка измерительной аппаратуры

Включение, вывод на режим и настройку спектрофлуориметров RF-5301 PC, RF-510 осуществляют в соответствии с инструкциями по их эксплуатации.

МИ 02067847.09-2018

10.8 Контроль стабильности градуировочной характеристики

10.8.1 Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят каждый раз перед анализом серии проб. Средствами контроля являются образцы, используемые для установления градуировочной зависимости по 10.1.2-10.1.7 (не менее 3 для каждой градуировочной зависимости).

Градуировочная характеристика считается стабильной при выполнении условия

$$|X - C| \leq 2 \sigma_R, \quad (1)$$

где X – результат контрольного измерения массовой концентрации хлорофилла "а" в образце, нг/см³;

C – приписанное значение массовой концентрации в образце, нг/см³;

σ_R – значение погрешности для X , нг/см³

Если условие стабильности не выполняется для одного из градуировочных образцов, необходимо выполнить повторное измерение этого образца для исключения результата, содержащего грубую погрешность. При повторном невыполнении условия, выясняют причины нестабильности, устраняют их и повторяют измерение с использованием других образцов, предусмотренных методикой. Если градуировочная характеристика вновь не будет удовлетворять условию (1), устанавливают новую градуировочную зависимость.

10.8.2 При выполнении условия (1) учитывают знак разности между измеренными и приписанными значениями массовой концентрации хлорофилла «а» в градуировочных образцах. Эта разность должна иметь как положительное, так и отрицательное значение, если же все значения имеют одинаковый знак, это говорит о наличии систематического отклонения. В таком случае требуется установить новые градуировочные зависимости.

11 Выполнение измерений

11.1 Экстракция хлорофилла «а» из воды

Пробу воды объемом от 100 до 1000 см³ с добавленными на месте отбора проб 20 см³ хлороформа экстрагируют 10 мин на механическом встряхивателе непосредственно в транспортной склянке. После экстракции все содержимое склянки переносят в делительную воронку. После четкого расслоения слоев нижний слой хлороформа сливают в градуированную пробирку вместимостью 25 см³ через воронку с ватой и сульфатом натрия. Количество сульфата натрия зависит от степени эмульсии

экстракта и добавляется до полного обезвоживания экстракта. Фиксируют объем экстракта.

11.2 Выполнение измерений

Интенсивность люминесценции экстракта хлорофилла «а» измеряют при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см на спектрофлуориметре. Из полученного показания вычитают интенсивность люминесценции хлороформа, используемого для экстракции.

Если интенсивность люминесценции экстракта выходит за пределы диапазонов, в которых проводилась градуировка, экстракт разбавляют и повторяют измерение. Учитывая высокую интенсивность люминесценции хлорофилла «а», необходимо проверять возможность концентрационного тушения. Для этого следует разбавить экстракт в 2 - 4 раза и снова провести измерение. Если при этом концентрация хлорофилла «а» уменьшается соответственно степени разбавления, за результат принимают первую величину. При увеличении концентрации или уменьшении, но не соразмерно степени разбавления, проводят разбавление экстракта и повторное измерение до тех пор, пока уменьшение концентрации хлорофилла «а» при очередном разбавлении будет соответствовать степени разбавления. За результат при этом принимают концентрацию хлорофилла «а», полученную при предпоследнем разбавлении.

11.3 Холостое определение

Для учета влияния используемых реактивов измеряют интенсивность люминесценции хлороформа при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм и $\lambda_{\text{люм}} = 675$ нм, используемого для экстракции, после пропускания его через слой ваты и сульфата натрия. Полученную величину вычитают из интенсивности люминесценции хлороформных экстрактов исследуемых проб воды.

11.4 Поправочные коэффициенты

Поправочный коэффициент, учитывающий потери хлорофилла «а» при экстракции анализируемой пробы и последующих стадиях анализа, установленный экспериментально добавлением известных количеств хлорофилла «а» к пробам воды, при концентрациях 0,1 мкг/дм³ равен 1,6, свыше 0,1 до 0,5 мкг/дм³ – 1,5, свыше 0,5 мкг/дм³ – 1,3.

12 Вычисление и оформление результатов измерений

12.1 Вычисление результатов измерений

Массовую концентрацию хлорофилла «а» в пробах воды X , мкг/дм³, рассчитывают по формуле

МИ 02067847.09-2018

$$X = \frac{C_{гр} \cdot V_{э} \cdot b}{1000 \cdot V} \cdot K_{попр} \quad (2)$$

где $C_{гр}$ – концентрация хлорофилла «а» в экстракте, найденная по градуировочному графику, мкг/см³;

$V_{э}$ – объем экстракта, см³;

b – степень разбавления экстракта; если разбавление не проводилось $b = 1$;

V – объем пробы воды, дм³;

$K_{попр}$ – поправочный коэффициент.

12.2 Оформление результатов измерений

12.2.1 Результат измерений хлорофилла «а» в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$X \pm \Delta, \text{ мкг/дм}^3, \quad (3)$$

где $\pm \Delta$ – границы погрешности измерений при принятой вероятности $P=0,95$ для данной массовой концентрации углеводов и смолистых компонентов, мг/дм³ (см. таблицу 1).

Численные значения результатов измерений должны оканчиваться цифрой того же разряда, что и значения характеристики погрешности, которые не должны содержать более двух значащих цифр.

12.2.2 Допустимо представлять результат в виде

$$X \pm \Delta_n \text{ при условии } \Delta_n < \Delta, \quad (4)$$

где $\pm \Delta_n$ – границы погрешности результатов измерений при $P=0,95$, установленные при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемые контролем стабильности результатов измерений.

12.2.3 Результаты измерений оформляют протоколом или записью в журнале, по формам, приведенным в Руководстве по качеству лаборатории.

13 Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

13.1 Общие положения

Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает:

- оперативный контроль среднеквадратического отклонения повторяемости процедуры анализа;

- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности).

13.2 Алгоритм контроля повторяемости (для двух измерений с использованием рабочих проб)

Контроль повторяемости осуществляют для каждого из результатов измерения рабочих проб, получаемых в соответствии с методикой анализа.

Процедура контроля предусматривает сравнение абсолютного расхождения r_k между двумя результатами определения концентрации хлорофилла "а" в рабочих пробах с пределом повторяемости

$$r_k = X_1 - X_2 < r, \quad (5)$$

где $r = 2,77 \sigma_r$.

Значения σ_r приведены в таблице 1.

Если условие (5) не выполнено, процедуру измерения повторяют. При повторном превышении предела повторяемости выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

Периодичность оперативного контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

14 Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

14.1 Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях, не должно превышать предела воспроизводимости. При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение. Значение предела воспроизводимости R , мкг/дм³, рассчитывают по формуле

$$R = 2,77 \cdot \sigma_R \quad (6)$$

где σ_R – показатель воспроизводимости, мкг/дм³ (см. таблицу 1).

14.2 При превышении предела воспроизводимости могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно ГОСТ Р ИСО 5725-6 (раздел 5) или МИ 2881.

14.3 Проверка приемлемости проводится при необходимости сравнения результатов измерений, полученных двумя лабораториями.

**МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды
(Росгидромет)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГИДРОХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ»**

344090, г. Ростов-на-Дону
пр. Стачки, 198

Факс: (863) 222-44-70
Телефон (863) 297-51-63
E-mail: info@gidrohim.com

СВИДЕТЕЛЬСТВО

об аттестации методики измерений
№ С.43.02067847.09.RA.RU.311345-2018

Методика измерений массовой концентрации хлорофилла «а» в природных (пресных и морских) водах люминесцентным методом, разработанная федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Кубанский государственный университет», 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, д. 149 и регламентированная МИ 02067847.09-2018 «Массовая концентрация хлорофилла «а» в природных (пресных и морских) водах. Методика измерений люминесцентным методом на 15 с., аттестована в соответствии с Приказом Минпромторга от 15.12.2015 г. № 4091.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы и экспериментальных исследований.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует метрологическим требованиям, приведенным в Федеральном законе от 26.06.2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

Показатели повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности приведены в приложении на 1 л., являющемся неотъемлемой частью настоящего свидетельства.

Директор ФГБУ «ГХИ»

Главный метролог

Дата выдачи свидетельства 20.12.2018.

М.М. Трофимчук

А.А. Назарова



Приложение

к свидетельству № С.

С.43.МИ 02067847.09.RA.RU.311345-2018

об аттестации методики измерений массовой концентрации хлорофилла «а» в природных (пресных и морских) водах люминесцентным методом

Таблица 1 – Диапазон измерений, показатели повторяемости, воспроизводимости, правильности и точности при принятой вероятности $P=0,95$

| Диапазон измерений массовой концентрации хлорофилла «а», мкг/дм ³ | Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $\sigma_r, \%$ | Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $\sigma_R, \%$ | Показатель правильности (границы относительной систематической погрешности $\pm \Delta c, \%$ | Показатель точности (границы относительной погрешности), $\pm \delta, \%$ |
|---|---|---|--|--|
| От 0,1 до 0,25 включ. | 4 | 5 | 5 | 14 |
| Св.0,25 до 5,0 включ. | 2 | 5 | 3 | 11 |

Таблица 2 – Диапазон измерений, значения пределов повторяемости и воспроизводимости при принятой вероятности $P=0,95$

| Диапазон измерений массовой концентрации хлорофилла «а», мкг/дм ³ | Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости), $r, \%$ | Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости), $R, \%$ |
|---|--|--|
| От 0,1 до 0,25 включ. | 12 | 15 |
| Св.0,25 до 5,0 включ. | 6 | 15 |

При реализации методики в лаборатории обеспечивают:

- оперативный контроль исполнителем процедуры выполнения измерений (на основе оценки повторяемости при реализации отдельно взятой контрольной процедуры);

- контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднего квадратического отклонения повторяемости, погрешности).

Алгоритм оперативного контроля исполнителем процедуры выполнения измерений приведен в МИ 02067847.09-2018.

Периодичность оперативного контроля и процедуры контроля стабильности результатов выполнения измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории.

Заведующий кафедрой
аналитической химии



З.А. Темердашев