

ПРОЦЕССЫ В ГЕОСРЕДАХ

2015
№1(1)

PROCESSES IN GEOMEDIA



ПРОЦЕССЫ В ГЕОСРЕДАХ

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

№ 1(1)

2015

PROCESSES IN GEOMEDIA

SCIENTIFIC JOURNAL

Volume 1(1)

2015

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНО-ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫРАЩЕННЫХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *Scenedesmus quadricauda***

Д.А. Хунджуга¹, А.В. Харчева¹, В.А. Терехова^{2,3}, М.М. Гладкова², Т.О. Попутникова²,
М.А. Пукальчик², Д.Н. Маторин⁴, И.Б. Полякова¹, С.В. Пацаева¹

¹ Физический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, spatsaeva@mail.ru

² Факультет почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова

³ Институт проблем экологии и эволюции РАН, Москва, vterekhova@gmail.com

⁴ Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова

Работа посвящена изучению спектральных откликов культуры микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*, часто используемой в задачах биотестирования, на химические и физические воздействия. Измерения проведены несколькими методами на различных приборах для суспензий клеток водоросли, выращенных в присутствии модельного токсиканта, а также при различающихся режимах освещения. В качестве показателей, характеризующих численность клеток, выбраны интенсивность флуоресценции хлорофилла, измеряемая двумя приборами, оптическая плотность суспензии, измеряемая двумя другими приборами, и поглощение нативного хлорофилла в красной области спектра, рассчитанное из спектров оптической плотности. Изменения фотосинтетической активности клеток водорослей характеризовали значением квантового выхода фотохимического превращения поглощенной световой энергии. В работе ставилась задача выявить связь интенсивности и формы спектра флуоресценции хлорофилла, параметров фотосинтетической активности, оптической плотности суспензии клеток, поглощения нативного хлорофилла с условиями выращивания микроводорослей сценедесмус и концентрацией клеток, определенной методом прямого счета.

Ключевые слова: биотестирование, спектр флуоресценции, хлорофилл

**THE USE OF SPECTRAL-OPTICAL METHODS TO CHARACTERIZE GROWN UNDER
DIFFERENT CONDITIONS OF MICROALGAE *Scenedesmus quadricauda***

D.A. Hundgua, A.C. Kharchev, V. A. Terekhov, M.M. Gladkov, T.O. Poputnikova,
M.A. Pukalchik, A.N. Matorin, I.B. Polyakova, S. C. Patsaeva

The work is devoted to study the spectral response of the culture of microalgae *Scenedesmus quadricauda*, often used in biological testing of chemical and physical effects. The measurements were made in several ways on different devices for cell suspensions of algae grown in the presence of model toxicant, as well as in different lighting modes. As indicators of the number of cells selected intensity of chlorophyll fluorescence measured by the two devices, the optical density of the suspension, measured two other devices, and the absorption of native chlorophyll in the red region of the spectrum, calculated from the spectra of optical density. Changes in the photosynthetic activity of algal cells characterized by the value of the quantum yield of photochemical conversion of absorbed light energy. In the work the goal was to identify the relationship of the intensity and form of the spectrum of chlorophyll fluorescence parameters of photosynthetic activity, optical density of cell suspensions, removals of native chlorophyll with the conditions of cultivation of the microalgae *Scenedesmus* and the cell concentration found by means of direct calculation method.

Keywords: biotesting, fluorescence spectrum, chlorophyll

Биотестирование широко используют в современной природоохранной практике. Помимо задач экологической оценки природных сред биотесты применяются для экспериментального установления класса опасности отходов производства и потребления [1]. В качестве стандартных тест-организмов чаще всего используют альгологически чистые культуры одноклеточных зеленых водорослей сценедесмус (*Scenedesmus quadricauda*) и хлорелла (*Chlorella vulgaris*) [2-4]. Традиционно оценку влияния вещества на одноклеточные водоросли сценедесмус оценивают по показателям изменения численности клеток водорослей (снижение или увеличение) в опытной среде по сравнению с контрольной средой. Достоверное снижение численности клеток водорослей более чем на 30%, либо прирост более чем на 20% в растворе вещества относительно контроля за 72 часа экспозиции является показателем токсического действия [2,3].

Для определения численности клеток фотосинтезирующих микроорганизмов чаще всего применяется подсчет клеток на специальных счетных стеклах под микроскопом. Такой подсчет является длительным и трудоемким процессом. Напротив, спектральные методы отличаются быстротой, высокой чувствительностью и возможностью их применения без разрушения объекта исследования. Некоторые экспресс-методы альготестирования на базе спектрально-оптических измерений на практике используются для определения токсичности водной или почвенной среды [5-11]. В качестве тест-реакций на присутствие токсикантов в среде обычно выделяют показатели, характеризующие численность клеток водорослей, такие как оптическая плотность суспензий [8] и интенсивность флуоресценции хлорофилла (Хл), или параметры фотосинтетической активности на основе измерения быстрой [6] и медленной флуоресценции [9].

Спектрально-люминесцентные методы не только характеризуют численность

клеток фотосинтезирующих организмов, но и позволяют проводить оценку *in vivo* функциональной активности фотосинтетического аппарата. К его изменениям могут привести многочисленные внешние факторы (низкая или высокая температура, присутствие солей тяжелых металлов, избыточная освещенность и др.) Наиболее чувствительным в этом отношении является фотосистема 2 (ФС2), ответственная за разложение воды и выделение кислорода. Флуоресценция Хл ФС2 наблюдается в виде свечения с максимумом при 685 нм. Изменения флуоресценции Хл говорят о состоянии реакционных центров этой фотосистемы. Перспективными представляются методы, использующие для возбуждения флуоресценции импульсное лазерное излучение [12], в частности, метод нелинейной лазерной флуориметрии [13-14].

Для диагностики фотосинтезирующих организмов *in vivo* используют также различия флуоресценции Хл при темновой адаптации клеток и на свету. При освещении клетки, которая пробыла в темноте достаточное время для темновой адаптации, интенсивность флуоресценции претерпевает ряд немонотонных изменений (эффект Каутского) [15-16]. Во время быстрой фазы происходит нарастание флуоресценции от начального значения F_0 до максимального F_m . Медленная индукция флуоресценции (МИФ) фотосинтезирующих объектов заключается в изменении интенсивности флуоресценции от максимального уровня F_m до стационарного значения F_t . Для фотосинтезирующих объектов МИФ является отражением целой системы регуляторных процессов, обеспечивающих оптимальное функционирование фотосинтетического аппарата. В литературе отсутствует однозначная интерпретация временного хода МИФ [17-18]. Несмотря на это, высокая чувствительность метода регистрации МИФ ко многим факторам, возможность

сопоставления количественных исследований с имеющимися теоретическими разработками делает этот метод весьма привлекательным как для выяснения механизмов регуляции, за счет которых достигается оптимальное сопряжение световой и темновой стадий фотосинтеза, так и для оценки функциональной активности фотосинтетического аппарата [19-20].

Такие параметры как величина квантового выхода $\Phi_{\text{C2}} Y = (F_m - F_0)/F_m$ – отношение уровня переменной флуоресценции $F_v = (F_m - F_0)$ к максимальной, фотохимическое тушение, нефотохимическое тушение помогают изучить изменения фотосинтетической активности клеток. Квантовый выход показывает долю использованной энергии света растениями для реакций фотосинтеза, своего рода это значение «КПД» клетки растения, способность улавливать и направлять энергию света в процесс синтеза необходимых растению веществ (углеводов). Чем больше значение квантового выхода, тем больший процент энергии улавливается растениями для фотосинтеза.

Для целей диагностики можно использовать и форму полосы свечения Хл. Флуоресценция Хл в клетках растений имеет два характерных максимума на длинах волн 685 и 740 нм. Отношение интенсивностей этих двух пиков зависит от общего содержания Хл [21-22], видового различия растений, влияния антропогенного воздействия на растения [23] и других факторов. На большом числе объектов показано, что величина F_{740}/F_{685} является интегральным показателем физиологического состояния и фотосинтетической активности растений [24]. Используется также обратная величина – отношение интенсивностей флуоресценции на 685 и 740 (или 730) нм.

Данная работа посвящена изучению спектральных откликов культуры клеток микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, часто используемой в задачах биотестирования, на присутствие в среде роста токсиканта и различные режимы освещения. Ставилась задача выявить

связь интенсивности и формы спектра флуоресценции хлорофилла, поглощения нативного хлорофилла, оптической плотности суспензии клеток, параметров их фотосинтетической активности с концентрацией клеток микроводоросли *Scenedesmus* и условиями ее выращивания.

Экспериментальная часть. Объекты исследования и условия эксперимента

Материалом для исследований служила альгологически чистая культура одноклеточных пресноводных водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb, выращенная на среде Успенского-1 в соответствии с методикой [3]. Состав среды (г/л): KNO_3 -0.250, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.025, K_2CO_3 – 0.345, $\text{MgSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.025, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.144; растворы микроэлементов - 1 cm^3 из смеси H_3BO_3 – 2.86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1.81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.222 г/л; MoO_3 – 17.64; NH_4VO_3 – 22.96 мг/л. До начала экспериментов водоросли культивировали при температуре $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ и периодическом освещении (12 часов свет $30 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$: 12 часов темнота).

Эксперимент с различными режимами освещения при культивировании водорослей в люминостате с освещенностью $60 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ проводили как при постоянном освещении, так и с периодическим выключением освещения каждые сутки на 8 часов («переменное освещение»). Максимальная концентрация водорослей в экспериментах составляла 1,2 млн клеток/мл. В пробах после тщательного перемешивания проводили подсчет численности клеток микроводорослей в камере Горяева и отбирали по два образца из каждой повторности для спектрально-оптических измерений. Для получения образцов с различной концентрацией клеток культуры разбавлялись питательной средой непосредственно перед началом измерений.

В эксперименте с модельным токсикантом серию растворов дихромата калия производства Sigma в концентрациях от 0.1 до 2.5 мг/л готовили на дистиллированной воде (pH 5,5), доведенной 10% раствором гидроксида натрия до pH 7.0 [9]. В испытуемый

раствор дихромата калия добавляли раствор среды Успенского-1 из расчета 6.4 мл среды Успенского на 100 мл испытуемого раствора. Далее вносили концентрированную культуру водорослей, находящуюся в экспоненциальной стадии роста. Продолжительность опыта 72 часа в соответствии с методикой [3] при непрерывном освещении светом $30 \mu\text{E}/\text{м}^2\text{с}$. Оптическая плотность суспензий клеток не превышала 0.1 на длине волны возбуждения флуоресценции хлорофилла (475 или 620 нм). В качестве среды для контрольного образца использовали среду Успенского-1 без добавления токсиканта. В пробах после тщательного перемешивания проводили подсчет численности клеток микроводорослей под микроскопом в камере Горяева и отбирали по два образца из каждой повторности для спектрально-оптических измерений.

Методы и аппаратура спектрально-оптических измерений

Спектры оптической плотности регистрировали на спектрофотометре Unicо (США) в стандартных кварцевых кюветах для с длиной оптического хода лучей 1 см. Спектры измерялись по отношению к питательной среде без модельного токсиканта или гуминового препарата. Величина поглощения Хл D_{chl} рассчитывалась после вычитания «фона», обусловленного рассеянием. Аппроксимация «фона» осуществлялась прямой линией, проходящей через точки спектра на длинах волн 640 и 720 нм.

Измерения спектров флуоресценции при возбуждении различными длинам волн проводили с помощью флуориметра Solar CM2203 в стандартных кварцевых кюветах при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Параметры флуоресценции клеток - фоновую флуоресценцию F_0 адаптированных к темноте клеток и квантовый выход фотохимического превращения поглощенной световой энергии $Y = (F_m - F_0)/F_m$ - регистрировали на двухканальном флуориметре ToxY-PAM (Walz, Германия) при интенсивности фоновой подсветки $5 \text{ мкE}/\text{м}^2\text{с}$.

Измерение оптической плотности суспензии водорослей на фиксированной длине волны проводили на приборе ИПТ-02 («Энерголаб», Россия). Величина оптической плотности регистрировалась в круглой кювете («пенициллиновом» флаконе) на фиксированной длине волны 660 нм, близкой по спектру к длинноволновому максимуму поглощения хлорофилла [8].

Спектры оптической плотности суспензий микроводорослей

Типичные спектры оптической плотности суспензии культуры зеленых водорослей содержат полосы поглощения основных пигментов каротиноидов (400...550 нм) и Хл (650...700 нм), и при этом гораздо более значительный вклад вносит светорассеяние, убывающее с ростом длины волны (рис. 1-2). Как было показано в работе [25], относительный вклад светорассеяния в общую величину оптической плотности для культуры сценедесмус больше, чем для хлореллы, это связано с тем, что клетки сценедесмус значительно крупнее и часто образуют ценобии (колонии) из 4-16 продолговатых клеток, соединенных боковыми стенками.



Рисунок 1. Спектр оптической плотности суспензии *Scenedesmus quadricauda* с различной концентрацией клеток.

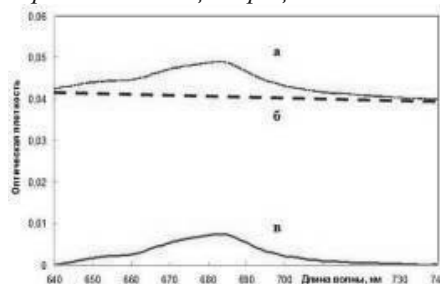


Рисунок 2. (а) - спектр оптической плотности суспензии *Scenedesmus*

quadricauda в области поглощения Хл 640...720 нм с 0,1 мг/л дихромата калия в среде роста; (б) - линейная аппроксимация «фона» светорассеяния; (в) – спектр поглощения нативного Хл.

Рис. 1-2 показывают, что светорассеяние преобладает в спектрах оптической плотности суспензии клеток, и на его фоне полоса поглощения Хл в области длинноволнового максимума 640...720 нм плохо выделяется. Общая величина оптической плотности напрямую не связана с численностью клеток водорослей, а определяется общим количеством рассеивающих частиц (живых и отмерших клеток тест-культуры, посторонних частиц) и их размерами. Поэтому светорассеяние необходимо учитывать при использовании оптической плотности или поглощения для оценки численности клеток микроводорослей. Для расчета поглощения нативного Хл в данной работе «фон» рассеяния вблизи полосы поглощения 640...720 нм аппроксимировали линейной функцией.

Кроме того, рис. 2 демонстрирует, что выбор длины волны 660 нм в методике [8] не является оптимальным для регистрации поглощения Хл, который в суспензии клеток *Scenedesmus* имеет максимум при 680...685 нм.

После добавления дихромата калия в качестве модельного токсиканта в среду культивирования водорослей спектры оптической плотности суспензий клеток претерпели значительные изменения - в УФ диапазоне появились полосы поглощения света ионами соли с максимумами 275 и 375 нм (рис. 3).

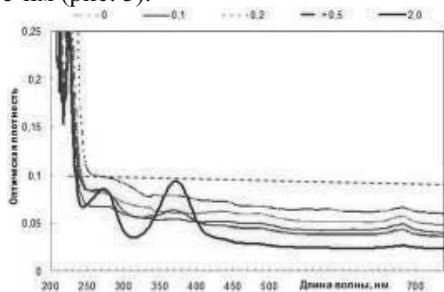


Рисунок 3. Спектры оптической плотности суспензии культуры клеток микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

при добавлении токсиканта. Концентрация дихромата калия приведена в мг/л

По интенсивности этих полос можно оценить концентрацию данного токсиканта в среде культивирования. Рис. 4 показывает линейность зависимости площади полосы поглощения с максимумом 375 нм от концентрации дихромата калия в среде.

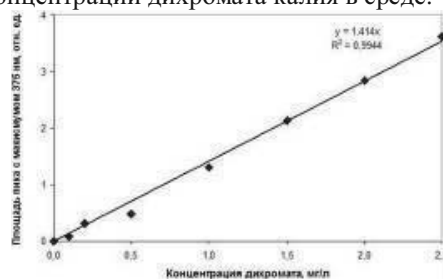


Рисунок 4. Зависимости площади полосы поглощения с максимумом 375 нм от концентрации дихромата калия в среде.

Спектры флуоресценции суспензий клеток микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

На рис. 5 показаны типичные спектры флуоресценции при возбуждении длиной волны 475 нм. Максимум на длине волны 685 нм соответствует свечению Хл *a*.

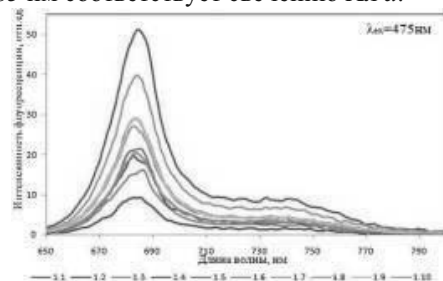


Рисунок 5. Спектры флуоресценции для суспензии клеток культуры микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, выращенной при постоянном освещении. Длина волны возбуждения 475 нм

Было получено, что интегральная по спектру интенсивность флуоресценции для обеих длин волн возбуждения (475 и 620 нм) линейно зависит от концентрации клеток для обеих культур водорослей – выращенных при постоянном освещении и при переменном освещении, но с разных

коэффициентом линейной регрессии для каждого типа пробы. Было также установлено, что интенсивности флуоресценции Хл для длин волн возбуждения 475 и 620 нм линейно зависят от оптической плотности для культуры водорослей, выращенных при разных режимах освещения с различными коэффициентами линейной регрессии.

Отношение интенсивностей F685/F740 коротковолновой и длинноволновой флуоресценции Хл с максимума 685 и 740 нм является интегральным показателем физиологического состояния и фотосинтетической активности растения, и может изменяться у клеток одной и той же культуры в зависимости от условия выращивания. Однако в экспериментах с микроводорослями сценедесмус, выращенными при различных режимах освещенности (постоянное и периодическое освещение), отношение интенсивностей флуоресценции хлорофилла на длинах волн регистрации 685 и 740 нм равно 3.1 ± 0.1 и практически не зависит от концентрации клеток в диапазоне до 1.2 млн клеток/мл и от светового режима выращивания водорослей.

Сравнение чувствительности различных спектральных характеристик к модельному токсиканту

В работе была проведена серия токсикологических измерений отклика различных тест-показателей микроводорослей сценедесмус на воздействие модельного токсиканта в водных растворах с использованием различных методов измерения. Методом прямого счета клеток было показано, что дихромат калия оказывал ингибирующее действие на рост и развитие микроводорослей сценедесмус в диапазоне концентраций 1,5...2,5 мг/л. В диапазоне концентраций дихромата калия от 0,1 до 1,5 мг/л методом прямого счета клеток достоверных отклонений величины прироста численности клеток водоросли в опытных пробах и контроле выявлено не было.

Измерение концентрации клеток микроводорослей по параметру флуоресценции F_0 с использованием прибора ToхуРат, показало, что при увеличении концентрации дихромата калия в среде роста закономерно наблюдается эффект подавления роста микроводоросли относительно контроля. Зафиксировали достоверное снижение (более 28%) прироста клеток F_0 за 72 часа эксперимента во всех образцах, содержащих модельный токсикант. В диапазоне концентраций дихромата калия более 2,0 мг/л выявили более чем 50% снижение прироста клеток.

Известно, что квантовый выход Υ фотохимического превращения поглощенной световой энергии в ФС2 на свету при подавлении фотосинтетической функции водоросли загрязняющими веществами многократно снижается, а при стимуляции – возрастает. Полученные в эксперименте значения Υ варьировали от 0.6 для контрольного образца до 0.27 в присутствии 2.5 мг/л дихромата калия, что свидетельствует о нарушении процессов фотосинтеза в клетках водорослей при такой концентрации токсиканта.

Измерение оптической плотности образцов D_{660} на приборе ИПТ-02 не выявило линейной зависимости измеряемой тест-функции от концентрации модельного токсиканта. Наибольшим значением оптической плотности D_{660} (128% относительно контроля) характеризовался образец, содержащий 0.2 мг/л дихромата калия. В вариантах с внесением 0.1 и 0.5 мг/л дихромата калия оптическая плотность не отличалась достоверно от контроля. Ингибирование свыше 50% выявили в диапазоне свыше 2.0 мг/л.

Наглядное представление о сопоставимости результатов, полученных с использованием различных тест-показателей, дает сравнение отклонений измеряемых показателей в пробах относительно контроля (рис. 6), найденных по формуле: $I = \frac{I_k - I_n}{I_k} \cdot 100\%$,

где I – отклонение измеряемого показателя в пробе от контроля, %; I_k – значение

показателя в контрольном варианте; I_p – значение показателя в пробе.

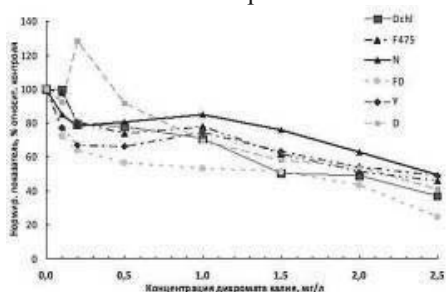


Рисунок 6. Сравнение результатов экспериментов по оценке токсичности дихромата калия на микроводоросли

Scenedesmus quadricauda с использованием различных тест-показателей. Точки на графике соединены для наглядности.

Результаты экспериментов показали, что тест-функция прироста численности клеток водорослей (N), показатели флуоресценции (F_0 и F_{475}), квантового выхода фотохимического превращения поглощенной световой энергии (Y), хорошо согласуются друг с другом с коэффициентами корреляции не хуже 0,90 (табл.1).

Таблица 1.

Коэффициенты множественной корреляции между значениями тест-показателей микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*

	F_0	Y	D_{660}	N	F_{475}	Dchl
F_0		0,96	0,71	0,95	0,92	0,90
Y	0,96		0,58	0,94	0,95	0,92
D_{660}	0,71	0,58		0,66	0,76	0,80
N	0,95	0,94	0,66		0,91	0,88
F_{475}	0,92	0,95	0,76	0,91		0,98
Dchl	0,90	0,92	0,80	0,88	0,98	

Лучше всего коррелируют с численностью клеток сценедесмус, определенной методом прямого счета, величины F_0 и Y (коэффициенты корреляции 0,95 и 0,94). Хуже всего согласуется с другими показателями величина оптической плотности суспензии клеток D_{660} (коэффициент корреляции 0,6...0,8). Плохая корреляция связана с тем, что измерение оптической плотности суспензии не учитывает эффект рассеяния света на клетках, их фрагментах и посторонних частицах - фактор, который не связан непосредственно с концентрацией живых клеток в суспензии.

Основные результаты и выводы

В работе ставилась задача выявить связь интенсивности и формы спектра флуоресценции хлорофилла, параметров фотосинтетической активности, оптической плотности суспензии клеток,

поглощения нативного хлорофилла с концентрацией клеток микроводоросли *Scenedesmus quadricauda*, часто используемой в задачах биотестирования, и условиями ее выращивания.

В экспериментах с различными режимами освещенности при выращивании культуры водорослей было показано, что интенсивность флуоресценции хлорофилла для каждого из пиков с максимумами испускания 685 и 740 нм линейно зависит как от концентрации клеток, так и от оптической плотности пробы. Это выполняется как для разных длин волн возбуждения (475 и 620 нм), так и для культур, выращенных при разных режимах освещения. Отношение интенсивностей флуоресценции хлорофилла на длинах волн регистрации 685 и 740 нм равно $3,1 \pm 0,1$ и практически не зависит от концентрации пробы и от светового

режима выращивания водорослей (постоянное или периодическое освещение).

В экспериментах с модельным токсикантом с помощью различных тест-показателей установлено, что дихромат калия оказывал ингибирующее действие на рост и развитие микроводорослей сценедесмус в диапазоне концентраций 1,5-2,5 мг/л в среде роста. Полученные в эксперименте значения квантового выхода фотохимического превращения поглощенной световой энергии Y варьировали от 0,6 для контрольного образца до 0,27 в присутствии 2,5 мг/л дихромата калия, что свидетельствует о нарушении процессов фотосинтеза в клетках водорослей при такой концентрации токсиканта. Установлено, что показатели флуоресценции F_0 и F_{475} ,

квантовый выход фотохимического превращения Y , и поглощение хлорофилла Dchl хорошо согласуются между собой и с высокой достоверностью коррелируют с показателем прямого счета клеток. Хуже всего согласуется с остальными показателями величина оптической плотности суспензии клеток D_{660} . Сделан вывод, что вклад рассеяния необходимо учитывать при измерении поглощения хлорофилла по спектрам оптической плотности

Благодарности. Работа выполнена при частичной поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России».

Литература

1. "Об утверждении Критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды". Приказ МПР от 15июня 2001г., № 511.
2. Филенко О.Ф. Водная токсикология. М.: Изд. Черноголовка. 1988. – 156 с.
3. Жмур Н.С., Орлова Т.И. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М.: Акварос, 2001. – 44 с.
4. Федосеева Е.В., Терехова В.А., Якименко О.С., Гладкова М.М. Экотоксикологическая оценка гуминовых препаратов разного происхождения с применением микроводорослей *Scenedesmus Quadricauda*. Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 45-50.
5. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты // Учебно-методическое пособие. М.: Альтрекс. 2012. – 138 с
6. Маторин Д.Н., Погосян С.И., Смуров А.В. Оценка качества среды инструментальными методами с использованием фототрофных организмов. В кн.: Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование / Под ред. Мелехова О.П., Егорова Е.И. М.: Изд-во Академия, 2007. С. 243–246.
7. Гаевский Н.А. Критерии и методология оценки структурно-функционального состояния альгоценоза на основе флуоресцентного анализа. Автореферат дисс. ... докт. биол. Наук. Красноярск, 2002.
8. Григорьев Ю.С., Тютков Е.А. Методика определения острой токсичности питьевых, пресных, природных и сточных вод, отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли сценедесмус (*Scenedesmus quadricauda*). М. 2011. – 40с. ПНД ФТ 14,1:2:4.17-2011Т, ФР 1.39.2011.09715
9. Васильев И.Р., Маторин Д.Н., Венедиктов П.С. Метод биотестирования природных вод по замедленной флуоресценции микроводорослей // Методы биотестирования вод. 1988. Вып. 1. С. 23-26.
10. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов // Министерство природных

- ресурсов РФ РЭФИА. НИИ. М.: Природа. 2002. – 117 с.
11. Schreiber, U., Muller J.F., Haugg A., Gademann R. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests // *Photosynth. Res.* 2002. V. 74. P. 317-330.
 12. Майор А.Ю. Лазерные измерительные системы для мониторинга фитопланктонных сообществ и процессов, влияющих на их состояние. Автореф. дисс. ... докт. техн. наук. Владивосток, 2006. – 39 с.
 13. Гостев Т. С., Фадеев В. В. Определение фотофизических параметров хлорофилла а в фотосинтезирующих организмах методом нелинейной лазерной флуориметрии // *Квантовая электроника*. 2011. Т. 41. № 5. С. 414–419.
 14. Гостев Т. С., Кузьминов Ф. И., Горбунов М. Ю., Фадеев В. В. Биофотоника водных фотосинтезирующих организмов: флуоресцентные методы диагностики // *Фотоника*. 2011. № 2. С. 72–81.
 15. Клейтон Р. Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., Мир, 1984. – 352 с.
 16. Lazar D. Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, V. 1412, P. 1-28.
 17. Рубин Б.А., Гавриленко В.Ф. Биохимия и физиология фотосинтеза. М., Изд-во Моск. Университета. 1977. – 328 с.
 18. Полякова И.Б. Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности. Дисс. ... канд. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 2002, – 147 с.
 19. Карабаев В.А. Нелинейные регуляторные процессы в фотосинтезе высших растений. Дисс. ... докт. физ.-мат. наук. М.: МГУ, 1990. – 416 с.
 20. Рубин А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге // *Соросовский образовательный журнал*. 2000. Т. 6. №4. С. 7-13.
 21. Saito, Y., Kurihara, K.-J., Takahashi, H.; Kobayashi, F., Kawahara, T.; Nomura, A., Takeda, S. Remote Estimation of the Chlorophyll Concentration of Living Trees Using Laser-induced Fluorescence Imaging Lidar. *Optical Review*. 2002. V. 9, No 2. P. 37-39.
 22. Агеев Б.Г., Зотикова А.П., Капитанов В.А., Клишкин А.В., Клишкин В.М, Макагон М.М., Матвиенко Г.Г., Понамарев Ю.Н., Фатеева Н.Л. Комплексный стенд оптической диагностики биосистем // *Оптика атмосферы и океана*. 2007. Т.20. № 1. С. 90 – 95.
 23. Фатеева Н.Л., Клишкин А.В., Бендер О.В., Зотикова А.П., Ямбуров М.С. Исследование лазерно-индуцированной флуоресценции хвойных и лиственных растений при азотном загрязнении почвы // *Оптика атмосферы и океана*. 2006. Т.19. № 2-3. С. 212–215.
 24. Saito R., Kawahara T. D., Nomura A., Satomi T. Development and performance characteristics of laser-induced fluorescence imaging lidar for forestry applications // *Forest Ecology and Management*. 2000. V. 128. P. 129–137.
 25. Пацаева С.В., Полякова И.Б., Хунджуа Д.А., Южаков В.И. Спектральные методы оценки концентрации клеток водорослей в суспензиях с коррекцией на светорассеяние // *Физические проблемы экологии (экологическая физика): Сб. науч. трудов под ред. В.И. Трухина, Ю.А. Пирогова, К.В. Показеева* – 2010, №17. С. 260-273.