

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИООПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОД ПО ИЗМЕРЕНИЯМ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ И РАССЕЯНИЯ СВЕТА В МОРСКОЙ СРЕДЕ

М.Е. Ли, Р.И. Ли, О.В. Мартынов*

Морской гидрофизический институт
г. Севастополь, ул. Капитанская, 2
E-mail: lee@alpha.mhi.iuf.net

* Институт биологии южных морей
г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

В статье рассмотрены принципы построения измерителей флюoresценции хлорофилла для подступниковых исследований. Предложен новый метод одновременного измерения флюoresценции и рассеяния света различных клеток фитопланктона и растворенного органического вещества в морской воде. Дано описание прибора, реализующего предложенный метод.

Введение. Информация о распределении фитопланктона в толще воды жизненно важна для понимания многих крупномасштабных физических и биологических процессов. Поэтому уже с начала двадцатого века первоначально немецкие, а затем и российские биологи уделяли особое внимание разработке методов определения биомассы, а затем и первичной продукции фитопланктона [1 – 3].

Определение в водоемах концентраций хлорофилла – фотосинтетического пигмента растительной клетки, позволяет получить информацию об интенсивности фотосинтеза и биомассе фитопланктона [3]. При проведении этих определений чаще всего используют спектрофотометрический метод определения хлорофилла [4]. Основные его этапы следующие: отбор проб, концентрирование планктона из отобранных проб, извлечение пигментов, измерение оптической плотности экстракта, расчет концентраций. В ходе концентрации пробы воды фильтруют через ацетатцеллюлозные мембранные или стекло-волоконные фильтры при помощи фильтровальной установки.

В олиготрофных водах для определения содержания хлорофилла применяется экстрактный флюорометрический

метод, в котором также присутствует этап фильтрования. При этом чувствительность флюорометрического метода определения содержания хлорофилла по сравнению со спектрофотометрическим на два порядка выше, и, соответственно, при его использовании необходим меньший объем фильтруемой пробы.

Однако экстрактные методы требуют длительного времени анализа проб воды, что является существенным их недостатком, особенно при исследовании больших акваторий. Низкая производительность исследований делает актуальной разработку экспрессных методов, позволяющих получать информацию о требуемых характеристиках *in situ* в реальном масштабе времени, без отбора проб и их подготовки. Наиболее перспективным в этих целях представляется использовать именно явление флюoresценции хлорофилла. Поскольку флюoresцентные методы позволяют работать с нативными объектами (при низких интенсивностях света, возбуждающий флюoresценцию, мало меняет физиологическое состояние тканей), обладают высокой чувствительностью и обеспечивают регистрацию динамики процессов.

Принципы построения измерителей флюoresценции. Среди различных видов флюориметрических измерений простейшим является измерение интенсивности свечения. Приборы для определения интенсивности свечения называются флюориметрами, их основой служит одна из трех оптических схем, представленных на рис. 1 [5, 6].

Любая из них включает источник возбуждения L , первичный Φ_1 и вторичный Φ_2 светофильтры, кювету K или держатель образца и приемник флюoresценции P . Назначение первичного светофильтра – из спектра лампы выделить участок в полосе поглощения исследуемого образца, задержав излучение лампы в полосе флюoresценции. Напротив, вторичный светофильтр должен обладать наибольшим пропусканием в полосе свечения и полностью поглощать излучение вне ее.

Данные флюориметров, которые измеряют флюoresценцию хлорофилла a , можно интерпретировать как распределение биомассы фитопланктона [7].

В последние несколько десятилетий, развитие техники позволило проводить мониторинг биомассы фитопланктона *in situ*. Сегодня флуоресценция хлорофилла *a* даже может быть измерена с самолетов или спутников [8, 9]. Однако дистанционными методами проводить измерения хлорофилла *a* на поверхности

океана можно только в светлое время суток. Измерения распределения концентрации хлорофилла *a* по глубине требуют использования погружаемых флюориметров. Это делает *in situ* флюориметры важнейшим инструментом океанографии XXI-го века, а их разработку актуальной задачей.

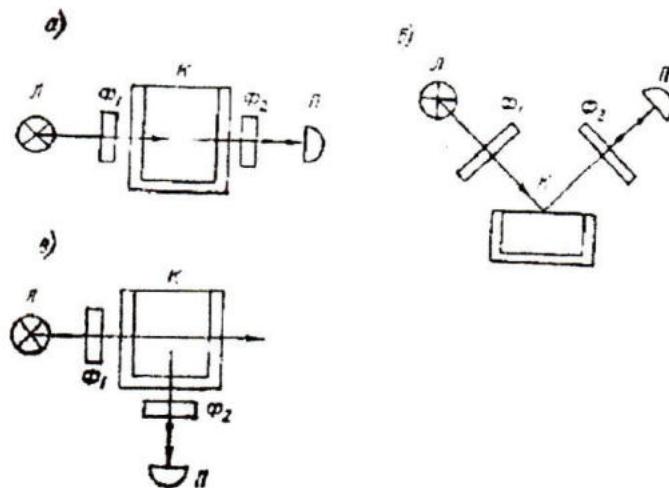


Рис. 1. Оптические схемы флюориметров для измерения интенсивности флюоресценции [6]:
а – в «проходящем свете»; б – при возбуждении с поверхности; в – под углом 90°

Наиболее распространенной схемой флюориметров, выпускаемых различными фирмами для морских экспедиционных исследований, является схема, представленная на рис. 1в. При этом возбуждение флюоресценции хлорофилла *a* производится в полосе 430–470 нм, а регистрация излучения в диапазоне 685–690 нм. Посредством откалиброванных *in situ* флюориметров концентрация хлорофилла *a* оценивается уже более 40 лет [10], и большая часть нашего знаний о пространственном распределении фитопланктона в Мировом океане обусловлена применением флюориметрических наблюдений [11, 12].

Однако следует отметить, что оценка биомассы фитопланктона по флюориметрическим наблюдениям имеет определенные ограничения, поскольку отношение между концентрацией хлорофилла, полученной измерением флюоресценции *in situ* и методом экстрагирования непостоянно [13, 14]. Источники изменчивости обусловлены [15]:

- конструкцией датчиков (чувствительность, быстродействие, спектраль-

ные диапазоны возбуждения и регистрации) [16];

- поглощением и распределением энергии возбуждения в клетке;
- упаковкой и композицией пигментов.

Изменчивость также наблюдается в зависимости от:

- размера клеток;
- содержания питательных веществ;
- фазы роста;
- фотоадаптации и освещенности;
- температуры окружающей среды;
- флуоресценции растворенного органического вещества (РОВ).

Следовательно, без дополнительной информации, оценка концентрации хлорофилла по флуоресценции *in situ*, которая, к тому же, будет включать и вклад феофитина, может отличаться от реальной, в лучшем случае в два раза, а то и более чем в десять раз [13].

Известно, что неучтенных факторов, как дискретность клеток фитопланктона в воде, фотоадаптация хлоропласта и изменение концентрации фотозащитных пигментов приводят к значительным

ошибкам при флюориметрическом определении содержания хлорофилла [17].

Поэтому различными авторами были проведены исследования, посвященные выяснению механизма влияния освещенности на флуоресцентные характеристики живых клеток фитопланктона и разработка методов учета этого влияния [18 – 20]. На основе этих исследований была предложена оптическая модель клетки фитопланктона [21, 22], которая предоставила возможность создать метод количественной оценки (с погрешностью 40 – 50%) концентрации

хлорофилла в природных водах посредством флюориметрических измерений с помощью погружающейся и дистанционной аппаратуры в условиях различной освещенности [17, 23]. В частности, метод может быть использован при проведении исследований на различных глубинах и в разное время суток. В этих работах концентрацию хлорофилла предлагается рассчитывать по результатам измерений вертикальных профилей интенсивности флуоресценции и горизонтальной облученности по формуле [23]:

$$C_{\text{хл.отн}}(H) = \frac{I_{\text{отн}}(H) \exp[D(H_0) - D(H)] \eta_b(H_0) Q^*(H_0)}{\eta_b(H) Q^*(H)},$$

здесь для обозначения концентрации хлорофилла использован символ C , а флуоресценции *in situ* символ I ; соответственно – $C_{\text{хл.отн}}(H) = C_{\text{хл}}(H)/C_{\text{хл}}(H_0)$, и $I_{\text{отн}}(H) = I(H)/I(H_0)$, где H_0 – опорный фиксированный горизонт; D – оптическая плотность фотозащитных пигментов; η_b – квантовый выход флуоресценции хлорофилла в хлоропласте клетки фитопланктона; Q^* – фактор эффективности флуоресценции частицы фитопланктона.

На основании экспериментальных данных и модельных расчетов в работах [17, 20 – 23] были установлены зависимости значений D , η_b и Q^* от уровня внешней освещенности. Вместе с тем, значения D , η_b и Q^* зависят еще и от видового состава планктона, а также от распределения клеток планктона по размерам [17, 23]. Таким образом, предложенный метод подразумевает, что кроме измерений вертикальных профилей интенсивности флуоресценции и горизонтальной облученности необходимо детальное изучение планктонного сообщества на опорном горизонте или же в районе исследований. Данное обстоятельство в значительной мере снижает оперативность мониторинга указанным методом пространственного распределения хлорофилла.

Следует отметить, что наибольшим по значимости источником изменчивости интенсивности флуоресценции является композиция видового состава фитопланктона [15]. Коэффициенты флуо-

ресценции статистически различны для пигментов различных таксономических групп. Непостоянство видового состава приводит к десятикратному изменению сигнала флуоресценции [15]. Посредством систематизации пигментов дисперсия может быть уменьшена.

С целью изучения возможности использования спектральной флуоресценции в качестве инструмента для оценки композиции пигментов фитопланктона Йенч с соавторами [24, 25] первыми провели исследования в конце семидесятых годов. Было выяснено, что различные классы водорослей имеют разные спектры возбуждения флуоресценции. Однако измерения всего спектра требуют слишком много усилий при крупномасштабных натурных исследованиях. Колбовски и Шрайбер [26] разрешили эту проблему, показав, что измерения только на четырех – пяти длинах волн, достаточны для различия четырех групп микроводорослей, наиболее распространенных в поверхностных слоях Мирового океана [27].

В связи с тем, что водоросли из одной таксономической группы содержат сходное количество и качество фотосинтетических пигментов, то спектр возбуждения их флуоресценции является подобным для каждой группы. Таким образом, можно различать группы водорослей по их спектру возбуждения флуоресценции. Выяснилось также, что ординаты спектров возбуждения для каждой таксономической группы при изменениях концентрации

микроводорослей в пробе изменяются по закону близкому к линейному. Поэтому для характеристики каждой группы были определены удельные спектры возбуждения флюoresценции, то есть спектры проб культур микроводорослей, в которых содержание хлорофилла составляло 1 мкг/л (рис. 2). Далее на основании удельных спектров по суммарному измеренному *in situ* спектру возбуждения с помощью методов линейной алгебры и статистики определялось количественное содержание разных классов водорослей.

Результаты этих исследований позволили фирме bbe Moldaenke (Германия) выпустить серию спектральных флюориметров различного назначения и конструкции. Среди них флюорозонд Fluoro-Probe [29], который, используя возбуждение на 5-ти длинах волн, позволяет определять общее и дифференцированное по группам содержание хлорофилла *a* в природных поверхностных водах. Прибор имеет также дополнительный канал возбуждения флюoresценции на 370 нм для определения содержания РОВ.

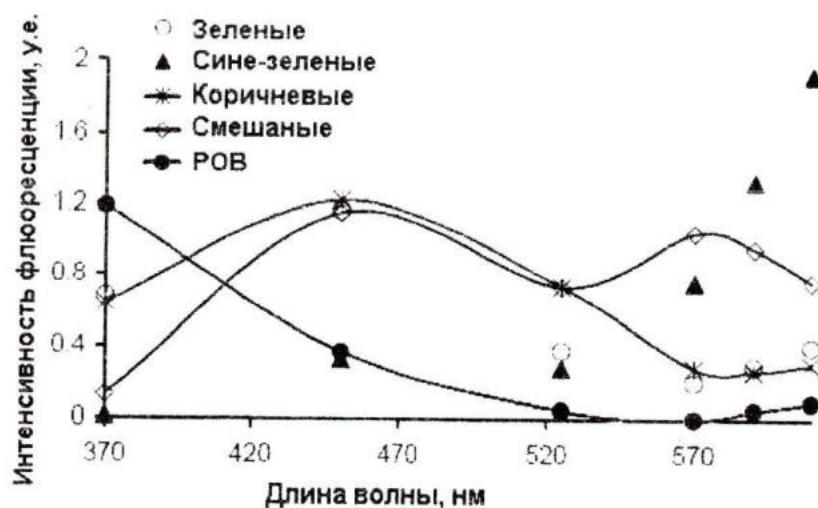


Рис. 2. Интенсивность флюoresценции водорослей разных систематических отделов, нормализованная по содержанию хлорофилла и по интенсивности светового потока [28]

Следует отметить, что для многих задач подспутникового обеспечения сканеров цвета моря и изучения состояния водных экосистем нужна информация и о количественном содержании взвеси, в частности – клеток фитопланктона. Эти знания существенно улучшают качество физической интерпретации данных подспутниковых измерений и позволяют совершенствовать методы решения обратных задач в оптике моря. Естественно, более полный набор первичных оптических характеристик позволяет разрабатывать более совершенные, физически обоснованные, аналитические модели восходящего излучения и биооптические алгоритмы.

Метод и прибор для одновременного измерения флюoresценции и рассеяния. Наиболее простым решением проблемы являлось бы привлечение дополнительных специально предназна-

ченных для этих целей приборов, но при этом возникает некоторая неопределенность из-за несовмещения измерительных объемов. Поэтому наиболее предпочтительным является создание такого метода измерений, который позволил бы определять всю совокупность необходимых параметров для одного и того же измерительного объема в одном приборе. Для этих целей в отделе Оптики моря Морского гидрофизического института предложен новый метод одновременного измерения флюoresценции и рассеяния света различных клеток фитопланктона и растворенного органического вещества в морской воде в спектральном диапазоне, охватывающем область от ближнего ультрафиолета до красной границы видимого спектра.

Это оказалось возможным благодаря использованию, представленной на

рис. 3, новой схемы измерений флюoresценции и рассеяния света в малых углах и под углом 90° в различных участках спектра для возбуждающего, флюoresцентного и рассеянного одним и тем же измерительным объемом излучений.

Главной отличительной особенностью предложенного метода одновременного измерения флюoresценции и рассеяния света в морской воде является то, что применяемые в настоящее время схемы измерений флюoresценции морской воды вводятся оптические уголковые отражатели (триппель-призмы). Триппель-призмы, установленные за измерительным объемом морской среды напротив источника параллельного пучка возбуждающего светового излучения и приемного устройства. Выбор в качестве отражателей триппель-призм обусловлен тем, что эти призмы обладают свойством отражать падающее на входную грань световое излучение строго в противоположном направлении независимо от угла падения пучка света. Это свойство триппель-призмы позволяет исключить возможность разъюстировки оптической схемы при незначительных механических деформациях элементов конструкции прибора. Возбуждающее световое излучение после отражения от триппель-призмы вновь про-

ходит сквозь измерительный объем морской воды в обратном направлении и входит внутрь контейнера источника излучения. При этом отпадает необходимость в световой ловушке для ограничения длины светового пучка, поскольку триппель-призма полностью перехватывает весь свет, прошедший через измерительный объем и направляет его обратно внутрь источника возбуждающего излучения. Поскольку весь мешающий световой поток поглощается внутри этого источника, то удается избежать фоновых засветок и обеспечить необходимое качество измерений. В результате применения триппель-призм удается в несколько раз увеличить чувствительность измерения флюoresцентного излучения, за счет того, что свет от источника возбуждающего флюoresценцию излучения дважды проходит через измеряемый объем, а светоприемное устройство воспринимает флюoresцентное излучение не только направленное в сторону фотоприемника, но также и отраженное от триппель-призмы. Поскольку оптические схемы измерения флюoresценции и рассеяния под углом 90° градусов практически идентичны, то и чувствительность измерения рассеяния под этим углом также увеличивается в несколько раз.

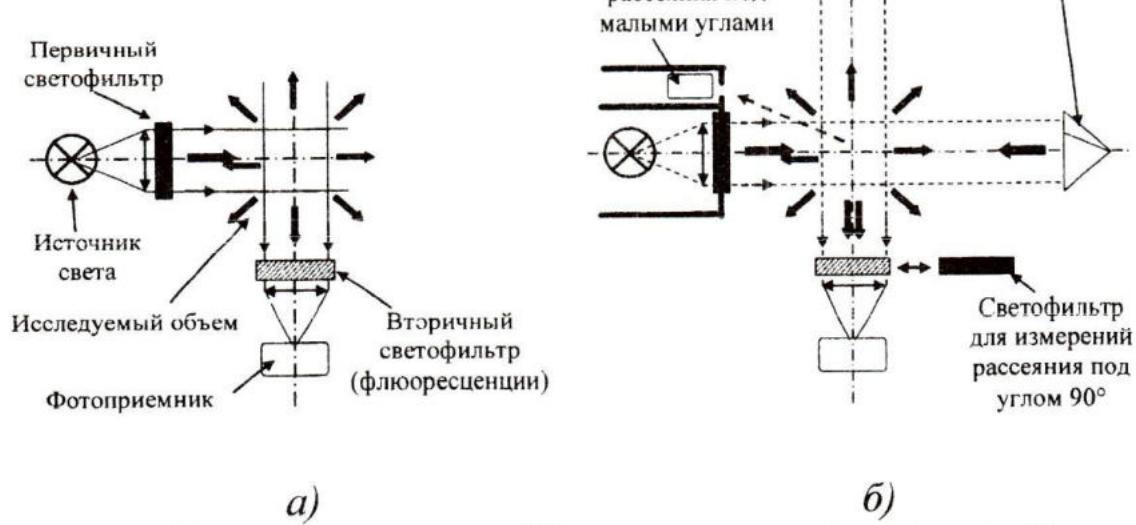


Рис. 3. Традиционная схема измерений флюoresценции – а; новая схема измерений флюoresценции и рассеяния света в малых углах и под углом 90° – б

При разработке измерителя, с целью повышения точности оценки содержания фитопланктона по измерениям флюоресценции, использован подход, изложенный в работах [28, 30], в котором для возбуждения флюоресценции фитопланктона использованы 4 спектральных интервала, соответствующих локальным

максимумам спектра возбуждения четырех спектральных групп микроводорослей, а также УФ интервал для оценки флюоресценции РОВ.

Полная схема прибора для одновременного измерения флюоресценции фитопланктона и рассеяния света под углами 4° и 90° приведена на рис 4.

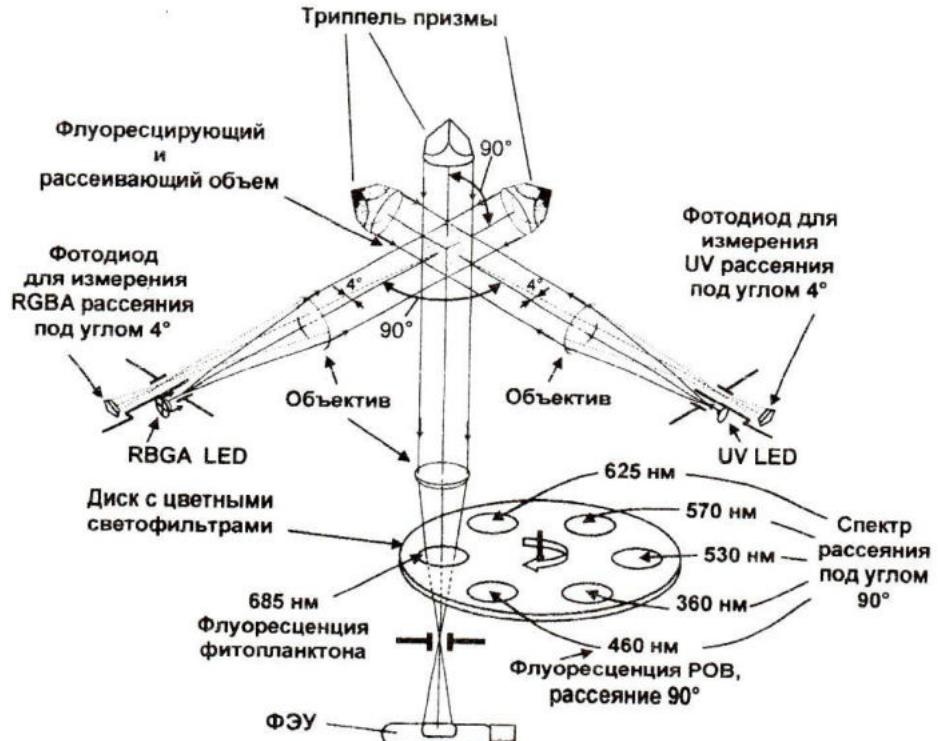


Рис. 4. Схема прибора для одновременного измерения флюоресценции фитопланктона и рассеяния света под углами 4° и 90°

Для измерения флюоресценции растворенного органического вещества в оптическую схему введен дополнительный источник возбуждающего ультрафиолетового светового излучения на длине волны 365 нм (UV LED см. рис. 4), расположенный под углом 90° относительно источника возбуждения хлорофилла (RGBA LED).

Оптическая схема с триплель-призмой дает также возможность легко реализовать измерение рассеяния в малых углах одновременно с возбуждением флюоресцирующего объема. Для этого внутри контейнеров источников возбуждающего излучения, размещены фотодиоды, улавливающий свет, рассеянный морской водой в области малых углов вблизи 4° – 6° . Как известно рассеяние света в малых углах тесно связано с

общим показателем рассеяния света и суммарной концентрацией крупной фракции морской взвеси [31].

Другое фотоприемное устройство с высокочувствительным фотоумножителем (ФЭУ) улавливает свет, рассеянный под углом 90° , и свет флюоресценции, вызванный возбуждающим излучением. Перед окном фотоумножителя установлен диск со сменными цветными светофильтрами, которые в определенных сочетаниях с цветом возбуждающего излучения позволяют отделять друг от друга свет рассеяния от света флюоресценции.

В качестве источника возбуждающего излучения для различных видов пигментов фитопланктона применен мощный многоэлементный светодиод RGBA, попеременное свечениe каждого из четырех цветовых элементов которого вы-

зывает рассеяние света на этой длине волны и флюoresцентный отклик соответствующего пигмента. Для определения концентрации растворенного органического вещества используется второй мощный ультрафиолетовый светодиод, излучающий на длине волны 365 нм.

Функциональная электрическая схема измерителя представлена на рис. 5. В измерителе использованы 5 спектральных интервалов возбуждения флюoresценции, которые обеспечиваются 2-мя сверхъяркими светодиодами фирмы LEDENGINE [32] с током питания 0,7А: 4-х цветным светодиодом с максимумами излучения 460 нм, 530 нм, 570 нм 625 нм и ультрафиолетовым светоизлучающим светодиодом ($\lambda = 365$ нм). Светодиоды включаются поочередно, длительность импульса – 0.5 мс.

Управление переключением светофильтров, режимами ФЭУ, коммутатором для поочередного включения светодиодов, оцифровка аналоговых сигналов

и формирование кадра в последовательном коде осуществляется микроконтроллером. Для передачи данных по кабелю в бортовой компьютер уровни выходных сигналов микроконтроллера преобразуются в уровни стандарта RS-232C. В состав измерителя включен датчик гидростатического давления, который позволяет получать информацию о формировании вертикальной структуры биооптических полей.

Циклограммы работы измерителя флюoresценции и рассеяния иллюстрируются на рис. 6.

В исходном положении диска с цветными светофильтрами перед ФЭУ установлен светофильтр с длиной волны 685 нм. Импульсами длительностью 0.5 мс поочередно включаются красный, оранжевый, зеленый и синий элементы 4-х цветного светодиода, длины волн излучения которых совпадают с локальными максимумами спектра возбуждения флюoresценции различных групп микроводорослей (см. рис. 2).

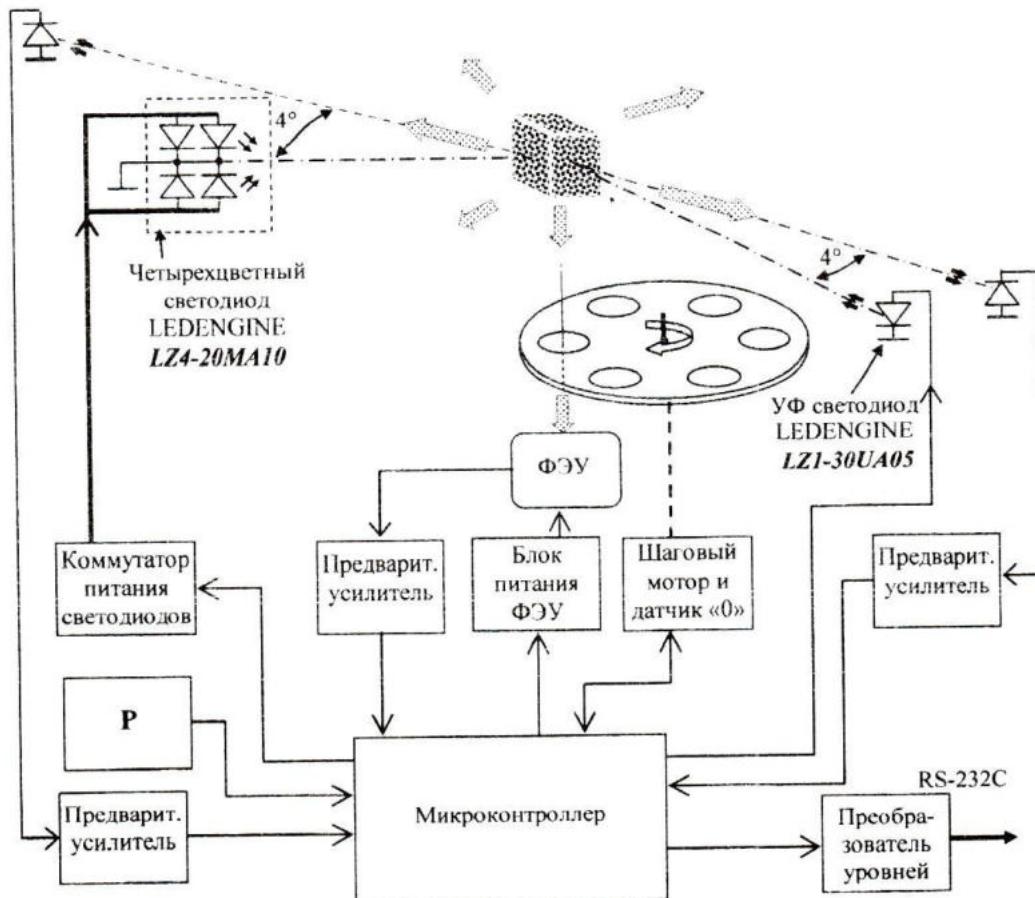
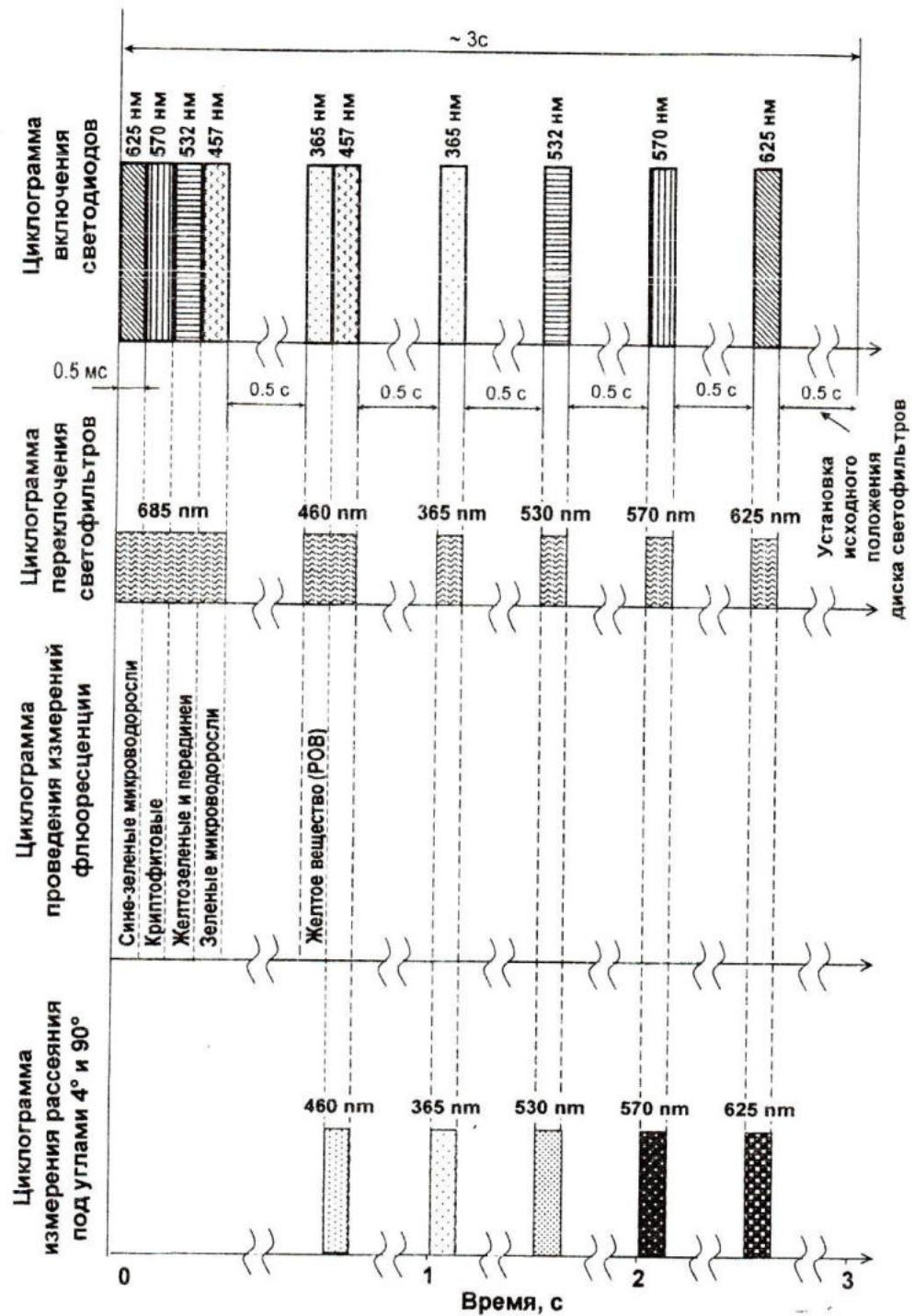


Рис. 5. Функциональная схема измерителя флюoresценции и рассеяния



Р и с. 6. Циклограммы работы измерителя флюоресценции и рассеяния

Вызванное этими вспышками излучение флюоресценции в диапазоне 685 нм, попадает на фотокатод ФЭУ, выходной сигнал которого, соответствующий каждому цветовому интервалу, после предварительного усиления и оцифровки запоминается в памяти микроконтроллера. На следующем шаге перед фотокатодом ФЭУ устанавливается светофильтр

$\lambda = 460$ нм. Импульсом УФ светодиода $\lambda = 365$ нм производится возбуждение флюоресценции желтого вещества (ЖВ). Результат измерения флюоресценции ЖВ на длине волны 460 нм также помещается в память.

Далее проводится цикл измерения параметров рассеяния. При неизменном положении диска светофильтров

(460 нм) подается импульс на синий элемент светодиода, и с помощью ФЭУ регистрируется сигнал рассеяния под 90° для $\lambda = 460$ нм. Фотоприемник, расположенный в том же контейнере, что и светодиод, обеспечивает измерение рассеяния под углом 4° . Потом устанавливается УФ светофильтр, и процедура измерения рассеяния производится для $\lambda = 365$ нм. Затем эта процедура повторяется для остальных светофильтров, после чего диск со светофильтрами приводится в исходное положение, и происходит передача данных из памяти микроконтроллера по линии связи в бортовой компьютер для дальнейшей обработки. Длительность цикла измерений зависит, главным образом, от скорости работы шагового двигателя при смене светофильтров, и, в нашем случае, составляет около 3 с.

Заключение. Применение флуоресцентных методов определения концентрации фитопланктона в сочетании с одновременными измерениями обилия содержания растворенного органического вещества и параметрами рассеяния позволяет в короткие сроки получать информацию о содержании оптически активных компонент в природных водах. Новизна нашего подхода состоит в том, что дополнительные сведения о рассеивающих свойствах исследуемого объема в области малых и больших углов позволяют оценить соотношение между фракциями мелкой и крупной взвеси, а также терригенной и биогенной составляющей взвеси [32]. Эта информация является важной при проведении валидации спутниковых данных, для разработки региональных алгоритмов дистанционного зондирования. Возможны и другие варианты применения данного метода. Например, в системе непрерывного контроля, которая послужит биоиндикатором благополучия экологического состояния водоема. В водоемах-охладителях при крупных промышленных объектах (АЭС, металлургические предприятия и др.) использование метода позволит контролировать обилие фитопланктона и вырабатывать рекомендации по управлению режимом водоема для оптимизации условий развития водорослей и сокращения затрат на очистку воды.

Работа проведена в Морском гидрофизическом институте при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (универсальный идентификатор проекта RFMEFI57714X0110).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронихин Н.Н. О содержании понятия "планктон" // Советская ботаника, 1940, №2. – С. 100 – 102.
2. Barthelmes D. Zur Abgrenzung des Planktons von den Nachbarbiocoenosen // Z. Fisheries, 1957, 6. – Р. 441 – 452.
3. Винберг Г.Г. Продуктивность и охрана морских и пресных водоёмов. – М.: Наука, 1989. – 135 с.
4. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – К.: Наук. думка, 1975. – 247 с.
5. Карапис В.М., Корнеева Э.А. Аппаратура для флуоресцентного анализа. – М.: Изд. Госстандарта при СМ СССР, 1970. – 208 с.
6. Карабашев Г.С. Флюоресценция в океане. – Л.: Гидрометеоиздат, 1987. – 199 с.
7. Вавилова В.В. О пятнах фитопланктона в море / В.В. Вавилова, Е.Б. Чернявский // Промысловая океанология. – М.: ЦНИИТЭИРХ, 1977. – № 3. – С. 1 – 18.
8. Behrenfeld M.J., Westberry T.K., Boss E.S. et al. Satellite-detected fluorescence reveals global physiology of ocean phytoplankton // Biogeosciences. – 2009, 6. – Р. 779 – 794.
9. Gower J.F.R., Brown L., Borstad G.A. Observation of chlorophyll fluorescence in west coast waters of Canada using the MODIS satellite sensor // Can. J. Remote Sens. – 2004, 30. – Р. 17 – 25.
10. Lorenzen C.J. A method for the continuous measurement of the in vivo Chlorophyll concentration // Deep-Sea Res. – 1966, 13. – Р. 223 – 227.
11. Cullen J.J. The deep Chlorophyll maximum: Comparing vertical profiles of Chlorophyll // Can. J. Fish. Aquat. Res. – 1982, 39. – Р. 791 – 803. – [doi:10.1139/f82-108].

12. *Dickey T.* The emergence of concurrent high-resolution physical and bio-optical measurements in the upper ocean // Rev. Geophys. – 1991, 29. – P. 383 – 413. – [doi:10.1029/91RG00578].
13. *Marra J. and C. Langdon.* An evaluation of an *in situ* fluorometer for the estimation of Chlorophyll *a*. – Tech. Rep. LDEO-93-1. – Lamont-Doherty Earth Observatory, Palisades. NY. – 1993. – 41 p.
14. *Marra J.* Analysis of diel variability in Chlorophyll fluorescence // J. Mar. Res. – 1997, 55. – P. 767 – 784. – [doi:10.1357/0022 2409 73224274].
15. *Christopher W. Proctor and Collin S. Roesler.* New insights on obtaining phytoplankton concentration and composition from *in situ* multispectral Chlorophyll fluorescence // Limnol. Oceanogr.: Methods, 8. – 2010. – P. 695–708.
16. *Neale P.J., Cullen J.J., Yentsch C.M.* Bio-optical inferences from Chlorophyll *a* fluorescence: What kind of fluorescence is measured in a flow cytometer? // Limnol. Oceanogr. – 1989, 34. – P. 1739 – 1748. – [doi:10.4319/lo.1989.34.8.1739].
17. Сидоренко В.М., Магомедов М.Д. Метод экспрессного флуориметрического определения концентрации хлорофилла в воде // Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ»: «Биотехнические системы в медицине и экологии». – 2006, 1. – С. 57 – 60.
18. *Collins D.J., Kiefer D.A., SooHoo B.J., McDermid I.S.* The role of reabsorption in the spectral distribution of phytoplankton fluorescence emission // Deep_Sea Research. – 1985. V. 32. No.8. – P. 983 – 1003.
19. *Mitchell B. G., Kiefer D. A.* Chlorophyll *a* specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton // Deep-sea research. – 1988, V.35. – P. 639 – 663.
20. Сидоренко В.М., Пакконен С.А. Изменение интенсивности флуоресценции воды при переходе органического вещества из взвеси в раствор // Изв. РАН, сер. Физика атмосферы и океана. – 1995, т.31, №5. – С. 731 – 734.
21. Сидоренко В.М. Молекулярная спектроскопия биологических сред. – М: Высш. шк., 2004. – 191 с.
22. Сидоренко В.М. Механизм влияния фотоадаптации на спектральные характеристики клеток фитопланктона // Материалы междунар. конф. по мягким измерениям и вычислениям. SCM-2000. Сб. докл. – СПб. – 2000. Т. 2. – С. 127 – 130.
23. *Магомедов М.Д.* Спектральные оптические методы экспрессной оценки характеристик экологического состояния акваторий // Кандидатская диссертация. – СПб. – 2006. – 126 с.
24. *Yentsch C.S., Yentsch C.M.* Fluorescence spectral signatures – characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission-spectra // J. Mar. Res.– 1979, 37. – P. 471 – 483.
25. *Yentsch C.S., Phinney D.A.* Spectral fluorescence – an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations // J. Plankt. Res. – 1985, 7. – P.617 – 632.
26. *Kolbowski J., Schreiber U.* Computer-controlled phytoplankton analyzer based on 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer // In: Mathis P. (ed.) Photosynthesis: from light to biosphere, vol. V. – Kluwer, Netherlands. – 1995. – P.825 – 828.
27. *Van den Hoek C., Mann D. & Jahns H.* Algae: An introduction to phycology // Cambridge University Press, Cambridge; New York. – 1996. – 640 p.
28. *Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B. et al.* A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ* // Photosynth. Res. – 2002, 72. – P.39 – 53.
29. <http://www.bbe-moldaenke.de/ru/chlorophyll/fluoroprobe/>
30. *Paresys G., Rigart C., Rousseau B. et al.* Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria // Water Research. 2005, V. 39. P. 911 – 921.
31. Шифрин К.С. Введение в оптику океана. – Л.: Гидрометеоиздат. 1983. – С. 184.
32. *Twardowski M S., Boss E., Macdonald J.B., Pegau W.S., Barnard A.H., Zaneveld. J.R V.* A model for estimating bulk refractive index from the optical back-scattering ratio and the implications for understanding particle composition in case I and case II waters // J. Geophys. Res. – 2001. V. 106, C7. – P. 14 129 – 14 142.
33. www.ledengin.com.