

Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова

Физический факультет

Кафедра общей физики

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Хунджуга Дарьи Александровны

на тему

**Спектральное исследование
микроорганизмов: микромицеты и
одноклеточные водоросли**

Зав. кафедрой общей физики

профессор

Салецкий Александр Михайлович

Научный руководитель

старший преподаватель

канд. физ. – мат. наук

Пацаева Светлана Викторовна

Москва 2010

Оглавление

Глава I. Спектральные исследования культуральной жидкости микромицетов.

Ведение.....4-5

Часть 1. Обзор литературы

1.1. Микромицеты и их роль в природе.....6-8

1.2. Гумус и его свойства.....9-10

1.3. Наноалмазы: применение в биологии и медицине.....11-12

1.4. Спектральные методы исследования.....13-15

Часть 2. Экспериментальная часть

2.1. Спектральные измерения и расчет квантового выхода флуоресценции16-17

2.2. Приготовление образцов культуральной жидкости микромицетов и растворов промышленных гуминовых препаратов для спектральных измерений.....18

2.3. Молекулярные фракции природного растворенного органического вещества.....19

2.4. Добавление наноалмазов в среду роста микромицета *Cladosporium cladosporioides*20

Часть 3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

3.1. Спектры флуоресценции раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него 21-23

3.2. Квантовый выход раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него24-26

3.3. Спектры поглощения и флуоресценции культуральной жидкости микромицета *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения27-29

3.4. Квантовый выход культуральной жидкости микромицета <i>Cladosporium cladosporioides</i> с добавлением наноалмазов и без их внесения	30-31
3.5. Основные результаты и выводы главы I.....	31-32

Глава II. Спектральные методы оценки концентрации клеток водорослей в суспензиях с коррекцией на светорассеяние.

<i>Введение</i>	33
-----------------------	----

Часть 1. Обзор литературы

1.1. Трудности спектрального анализа биологических объектов.....	34-36
1.2. Фотосинтетический аппарат клеток водорослей.....	37-41

Часть 2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты и методы.....	42
2.2. Спектры оптической плотности суспензии клеток.....	42-46
2.3. Спектры флуоресценции суспензии клеток.....	47-50
2.4. Коррекция флуоресценции на светорассеяние.....	51-52
2.5. Основные результаты и выводы главы II.....	53-54

<i>Основные результаты и выводы</i>	55
--	----

<i>Список литературы</i>	57-61
---------------------------------------	-------

Глава I. Спектральные исследования культуральной жидкости микромицетов

Введение

Спектральные методы широко применяются в экологических исследованиях благодаря своему быстрдействию, высокой чувствительности и простоте аппаратного оформления [1]. В данной дипломной работе ставилось целью изучение спектрально-люминесцентных свойств двух типов микроорганизмов - микроскопических грибов (микромицетов) и одноклеточных водорослей - и их продуктов жизнедеятельности, а именно: культуральной жидкости почвенных микромицетов, в том числе в присутствии гуминовых веществ как стимуляторов роста и наноалмазов как токсикантов, и суспензий двух культур водорослей в воде. Основные результаты данной дипломной работы опубликованы в работах [2-7].

Микромицеты являются не только неотъемлемым компонентом наземных и водных биоценозов, контролирующим широкий спектр биосферных функций, но и основной группой микроорганизмов, отвечающей как за синтез, так и деструкцию гуминовых веществ в почве. Именно поэтому, в период сильнейшего техногенного воздействия на окружающую среду, а также стремительного развития нанотехнологии, становится актуальной проблема изучения взаимодействия микромицетов с органическим веществом природного происхождения и наноструктурами [8]. Каким образом наноалмазы влияют на микроорганизмы, и каких результатов можно добиться путем внесения микромицетов в гуминовые препараты – на все эти вопросы мы попытались ответить в нашей работе.

В соответствии с поставленной целью дипломной работы задачами экспериментальной работы с микромицетами были следующие:

- Измерение спектров поглощения и спектров люминесценции культуральной жидкости (среды роста) микромицетов после фильтрации биомассы, выявление характерных особенностей в спектрах, типичных для исследуемых культур микроскопических грибов.

- Исследование трансформации гуминовых веществ под действием микромицетов путем сравнения спектральных характеристик растворов гуминовых препаратов до и после использования их в качестве среды роста почвенных грибов. Сравнение спектральных свойств промышленных гуминовых препаратов и гуминовых веществ природной воды.
- Исследование влияния присутствия наноалмазов в среде роста микромицета *Cladosporium Cladosporioides* на спектральные свойства культуральной жидкости.

1. Обзор литературы

1.1. Микромицеты и их роль в природе

Невозможно представить жизнь на планете без грибов. Они встречаются всюду и представляют собой неотъемлемый компонент наземных и водных биоценозов, контролирующий широкий спектр биосферных функций [9]. Никто не берется даже сказать, сколько видов грибов существует на планете. По самым приближенным оценкам, их - около 1,5 млн., но учеными описано пока лишь немногим более 100 тысяч видов.

Микромицеты поразительно живучи. Например, некоторые из них выдерживают даже смертельные дозы радиации. В серии опытов с грибами *Wangiella dermatitidis* и *Cryptococcus neoformans* их подвергли облучению, уровень которого в 500 раз превышал естественный радиоактивный фон, однако они не только выжили, но даже разрослись быстрее обычного. Примечательно, что эти плесневые грибы содержали в избытке пигмент меланин, благодаря которому энергия излучения в тканях этих микромицетов превращалась в химическую. Таким образом, если растениям необходим солнечный свет, то некоторым грибам, чтобы нормально развиваться, нужна радиация. Еще одно доказательство живучести грибов - их наличие после лесных пожаров. Именно микромицеты семейства пиронемовых быстро заселяют свежие пепелища, и вся эта территория постепенно покрывается крохотными - в миллиметры в поперечнике - шляпками, окрашенными в розовый или оранжевый цвет.

В научной литературе много написано о пользе грибов [10]. Симбиотические сообщества характерны почти для 95% наземных растений, и лишь немногие из них могут жить самостоятельно, не прибегая к помощи своих вековых партнеров-грибов. Грибы снабжают растения питательными веществами, растворенными в воде (прежде всего фосфатами), а те, в свою очередь, дают грибам углеводы, произведенные в большом количестве путем фотосинтеза. Оплетая корни деревьев, буквально срастаясь с ними, нити грибницы (гифы) образуют микоризу (дословно

«грибкорень»), которая растворяет фосфор и азот, содержащийся в органике, например, в опавшей листве, помогая дереву усваивать их.

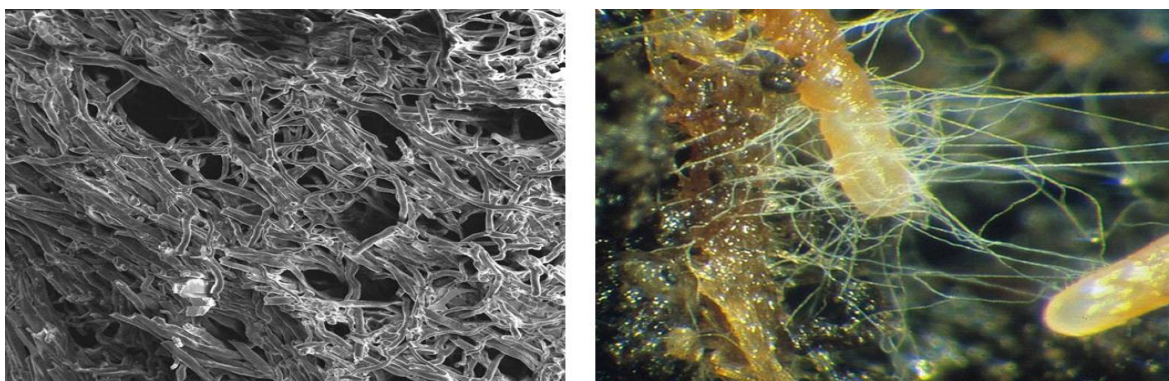


Рис. 1. Фотографии микоризы.

Также микроскопические ветвящиеся нити грибницы буквально выцеживают из почвы ядовитые вещества и становятся своего рода фильтрами, не давая корням пропитаться кадмием и цинком, ртутью и свинцом. Кроме того, в засуху именно грибы выискивают своим напарникам воду.

Микромицеты не только помогают растениям, но и меняют структуру почвы. Они вырабатывают в громадных количествах вещество, которое называется гломалин. Это - гликопротеин, сложный белок, содержащий углеводы. Именно этот белок заставляет рыхлую землю склеиваться в комочки. Без него верхний слой почвы смывался бы при каждом ливне. Содержание гломалина зависит от того, как ведется обработка земли.

Грибы содержат целый ряд не известных пока науке веществ [9]. Их можно было бы применить в разработке новых лекарств (как в свое время начали применять пенициллин). В медицине Китая и Японии давно используют целительную силу грибов, причем микотерапия основывается на строго научных принципах.

И, наверное, их главной особенностью является то, что грибы доминируют в составе микробиоты почв [8]. Они представляют самую многовидовую группу микроорганизмов, участвующую в минерализации органических растительных и животных остатков, в образовании почвенного гумуса. Скорость разложения органических веществ почв определяется такими факторами, как химический состав субстрата, эффективность обеспечения азотом микроорганизмов, состав

микробного населения и условия среды. Грибы в аэробных условиях способны разлагать даже сложные полимерные соединения, например, лигнин, в отличие от других микроорганизмов, которые более способствуют минерализации только низкомолекулярных органических соединений [11]. Некоторые почвенные грибы способны разлагать гумус и использовать его в качестве единственного источника азота и (или) углерода. При этом грибы участвуют не только в процессе деструкции гуминовых веществ, но и их образования.

Многие почвенные грибы образуют тёмноокрашенный мицелий, синтезируя и аккумулируя меланиноподобные пигменты, которые после отмирания и лизиса мицелия накапливаются в почве в составе почвенного гумуса. Меланины делятся на две группы: эумеланины (нерастворимые, черные и темно-коричневые пигменты) и феомеланины (растворимые в щелочах пигменты желто-красно-коричневого цвета). По ряду физико-химических и структурных характеристик феомеланины наиболее близки к гуминовым веществам. В литературе периода уже 70-х - 80-х были описаны экспериментальные данные, показывающие возможность формирования гумусоподобных веществ в культуральной жидкости плесневых грибов, актиномицетов и некоторых бактерий.

1.2. Гумус и его свойства

Гумус - это комплекс различных органических соединений и запас питательных веществ, образованный в почве (или другой среде, аналогичной почвенной) в процессе жизнедеятельности почвенных организмов: микробов, грибов и животных [12]. Он не только участвует в снабжении растений азотом, фосфором, калием и другими важными макро- и микроэлементами питания, но и неоспорима его роль и в других важнейших процессах почвообразования и обеспечения плодородия почв, таких, как предохранение почв от выветривания, создание их гранулярной структуры, снабжение растений необходимой для фотосинтеза углекислотой, биологически активными ростовыми веществами.

Но, как известно, образование природного гумуса является результатом длительных (десятилетия и столетия) и разнообразных процессов разложения и консервации веществ растительного и микробного происхождения, скорость и характер которых определяются многими причинами: ландшафтно-климатическими условиями, составом растительности, микробным и животным населением почвы. Промышленные гуминовые препараты сильно отличаются от природных по своим физико-химическим показателям [6], именно поэтому сохранение и преумножение запасов природного гумуса - одна из первоочередных задач.

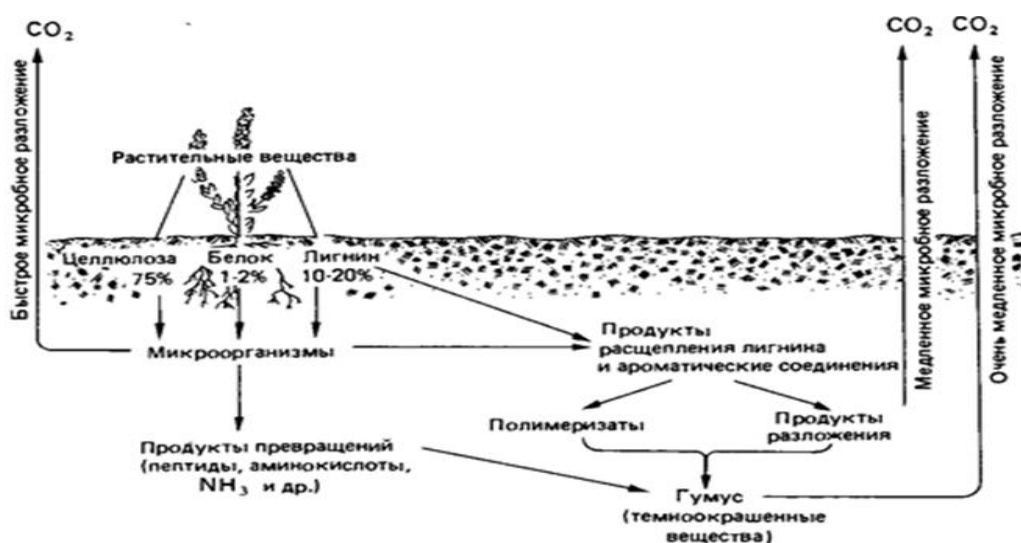


Рис. 2. Схема превращений растительных веществ в почве и образование гумуса.

Если говорить о пользе гумуса, то в последнее время вышло много работ, в которых хорошо продемонстрирован значительный положительный эффект, оказываемый гуминовыми кислотами на растения. Это влияние хорошо заметно как во внешнем виде растений, так и во внутренних биохимических процессах. Кроме того, в нескольких работах четко установлено, что гуминовые субстанции увеличивают степень прорастания семян и содержание витаминов в растениях. Также, гуминовые кислоты и их производные увеличивают проницаемость клеточных мембран, увеличивая тем самым способность растений вбирать питательные вещества. Многими учеными был обнаружен положительный эффект, оказываемый гуминовыми кислотами на размножение различных групп микроорганизмов.

Еще более существенна роль гумуса в увеличении отдачи при умелом применении химических удобрений, эффективность его при этом увеличивается в 1,5÷2 раза. Однако необходимо помнить, что химические удобрения, внесенные в почву, вызывают усиленное разложение гумуса, что приводит к снижению его содержания [13].

И, пожалуй, главное экологическое свойство гумуса - связывание тяжелых металлов в почве и предохранение всего живого на Земле от их токсического воздействия, в том числе от тяжелых радионуклидов [14]!

1.3. Наноалмазы: применение в биологии и медицине

Ультрадисперсные алмазы или наноалмазы представляет собой совокупность частиц диаметром от 2 до 10 нм с удельной поверхностью более 250 м²/г [15]. Наноалмазы состоят в среднем на 80-88% из углерода, который находится в алмазной фазе. Имеются также кислород (10% и выше), водород (0.5-1.5%), азот (2-3%) и несгораемый остаток (0.5-8.0%), который состоит из оксидов, карбидов и солей различных элементов, таких как Fe, Ti, Cr, Cu, K, Ca, Si, Zn, Pb и т.д. Эти соединения наряду с неалмазным углеродом относятся к группе трудноудаляемых твёрдофазных примесей. Что же касается кислорода, азота и водорода, то обычно считается, что они входят в состав трудноудаляемых летучих примесей. Действительно, часть их заключена в молекулах сорбированных на наноалмазах соединений (CO, CO₂, N₂, H₂O и т.д.), которые могут находиться на доступной поверхности или быть замурованными в порах. Но другая часть этих атомов обязательно находится в составе функциональных поверхностных групп, и они не являются примесями, а неотъемлемой частью надмолекулы наноалмазов. Функциональные группы можно разрушить, обменять на другие, но они всегда присутствуют на поверхности наноалмазов, так же как и на макрокристаллах и зернах порошков алмаза других типов [16].

Наличие большого количества функциональных поверхностных групп приводит к тому, что наноразмерные алмазы склонны к агрегации с образованием первичных и вторичных структур. Образование агрегатов помимо термоконцентрационных условий определяется и физико-химическими свойствами поверхности частиц. При этом в зависимости от природы функционального покрова существенно изменяются коллоидные свойства наноалмазов. Частицы агрегируют в сухих порошках и суспензиях, образуя более прочные первичные (до 1-5 мкм) и менее прочные вторичные (до 200 мкм) агрегаты. После химической очистки наноалмазы вследствие агломерации образуются частицы размером до нескольких микрометров. Нагревание в инертной атмосфере при температуре больше 873 К приводит к росту частиц наноалмазов, которые принимают форму сферолитов (150-200 мкм).

До недавнего времени наноалмазы являлись традиционным объектом исследования у специалистов, работающих в области физики и химии твердого тела, материаловедения, электроники, электрохимии, и применялись как наноматериал технического назначения [17]. Однако физико-химические свойства наноалмазов позволяют говорить о перспективности их применения в нетрадиционных областях - биологии и медицине [18].

Доказана возможность применения наноалмазов как полифункционального адсорбента для эффективного выделения и очистки белков в объеме (in batch) из рекомбинантных источников и природных объектов, а также дополнительной очистки белковых препаратов, производимых коммерческими фирмами. Установлено, что модифицированные наноалмазы адсорбируют линейные и не связывают кольцевые молекулы ДНК, что позволяет говорить о потенциальной возможности их применения в создании новых технологий для молекулярной биологии и генной инженерии. Высокие адсорбционные свойства наноалмазов к соединениям биологической и небиологической природы позволяют говорить о перспективности их применения в медицинских целях как нового адсорбента и энтеросорбента для связывания и нейтрализации нежелательных и токсичных соединений, а также как носителя лекарственных препаратов. Установлено, что наноалмазы проявляют каталитическую активность в органических реакциях, благодаря чему появляется возможность использовать наноматериал не только как адсорбент, но и как катализатор дезактивации микотоксинов. Кроме того, в настоящее время разработаны технологии получения модифицированных наноалмазов, обладающих высокой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах, адаптированных для медико-биологических исследований.

1.4. Спектральные методы исследования

Взаимодействия микромицетов с органическим веществом природного происхождения изучается на протяжении долгого времени и с помощью самых разнообразных методов, однако экспрессность, высокая точность и простота аппаратного оформления выгодно отличают спектральные методы от остальных.

Абсорбционная спектроскопия

Электронные спектры поглощения - это спектры, получающиеся при прохождении излучения с непрерывным спектром в веществе и его избирательном ослаблении на некоторых длинах волн за счет поглощения [19]. Они возникают при квантовых переходах с нижних (невозбужденных) электронных уровней энергии на верхние (возбужденные). Спектр поглощения – это зависимость величины, характеризующей поглощательную способность вещества, от длины волны λ или волнового числа ν падающего света.

Основной закон поглощения света – *закон Бугера—Ламберта—Бера* - это закон ослабления монохроматического света при поглощении его слоем вещества:

$$I_l = I_0 e^{-\varepsilon Cl},$$

где I_0 - интенсивность падающего на образец света, I_l - значение интенсивности после прохождения слоя толщины l . Коэффициент ε относят к слою толщиной 1см с концентрацией раствора $C=1$ моль/литр и называют *молярным коэффициентом экстинкции*.

Отношение интенсивности света, прошедшего через слой толщины l , к величине интенсивности падающего света называется *пропусканием* $T=I_l/I_0$ слоя и обычно выражается в процентах. Из закона Бугера—Ламберта—Бера следует, что пропускание вещества T не зависит от интенсивности падающего света, но является функцией длины волны. T может принимать значения от 0% (свет полностью поглощается веществом) до 100% (полностью прозрачная среда для длины волны измерения). Величина T , отнесенная к толщине слоя 1см, называется коэффициентом пропускания.

Для практических целей обычно используют десятичный логарифм обратной величины T , который называют *оптической плотностью* D слоя толщины l :

$$D = \lg (1/T) = \lg (I_0 / I_l) = \varepsilon_{10} \cdot C \cdot l.$$

Это безразмерная величина. Величина молярного коэффициента экстинкции $\varepsilon_{10} \approx 0,4343\varepsilon$ численно равна оптической плотности раствора с концентрацией 1 моль/литр при толщине слоя (длине кюветы) 1 см.

Коэффициент экстинкции ε не зависит от концентрации раствора и толщины проходимого светом слоя. Степень поглощения света неодинакова при различных длинах волн. Зависимость величины, характеризующей поглощение (D, ε) от длины волны, частоты или волнового числа и является спектром поглощения.

Флуоресцентная спектроскопия

Флуоресцентная спектроскопия имеет несколько преимуществ перед спектроскопией поглощения. В первую очередь, она является более чувствительным методом и обладает большей селективностью за счет возможности, варьируя длину волны возбуждения, изучать свечение разных типов флуорофоров. Она используется для быстрого получения характеристик органического вещества, особенно в форме раствора.

Люминесценция - свечение, возникающее в результате электронного перехода атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов при их возвращении из возбужденного состояния в основное. Для того, чтобы отличить люминесценцию, происходящую при переходах с синглетных уровней, от люминесценции, происходящей при переходах с метастабильных триплетных уровней, используют термины «флуоресценция» и «фосфоресценция».

Спектр флуоресценции - это зависимость интенсивности флуоресценции либо от длины волны λ , либо от волнового числа ν . Прибор для измерения спектров флуоресценции называют спектрофлуориметром или просто флуориметром. Стандартный прибор может измерять три типа спектров - спектры испускания флуоресценции, спектры возбуждения флуоресценции и синхронные спектры.

Спектр испускания – это зависимость интенсивности люминесценции, измеренной в квантах на единичный интервал длин волн, от длины волны. Спектр испускания записывают, выбирая подходящую длину волны возбуждения и сканируя монохроматор испускания при постоянных щелях по длинам волн. Получают неисправленный спектр испускания, искажения которого определяются зависимостью системы регистрации от длины волны.

Спектр возбуждения – это зависимость интенсивности испускания при определенной длине волны от длины волны возбуждения. Для записи спектра возбуждения монохроматор испускания устанавливают на желаемую длину волны, в большинстве случаев – на максимум испускания. После этого осуществляют сканирование светового потока из монохроматора возбуждения по полосам поглощения люминофора при постоянных щелях. Получают неисправленный спектр возбуждения, который зависит от характеристик спектрофлуориметра.

2. Экспериментальная часть

2.1. Спектральные измерения и расчет квантового выхода флуоресценции

Спектры испускания флуоресценции получали на спектрометре Solar CM 2203. Пробы культуральных жидкостей предварительно разбавляли в 10 раз, а затем снимали спектральные зависимости для каждой из трех значений длины волны возбуждения ($\lambda_{\text{ex}} = 270, 310$ и 355nm). Для дальнейшего расчета квантового выхода флуоресценции на спектрофотометре Unicо были сняты спектры поглощения для неразбавленных культур. Все спектры снимались в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10мм.

Квантовый выход - одна из важнейших характеристик флуоресценции. Под ней понимают величину, показывающую отношение среднего числа излученных квантов на один поглощенный:

$$\Phi = N_{\text{изл}} / N_{\text{п}},$$

где $N_{\text{изл}}$ - число излученных квантов, $N_{\text{п}}$ - число поглощенных квантов.

Для расчета квантового выхода необходимо снять спектры испускания флуоресценции и спектры поглощения. Вначале находим значение интегральной интенсивности образца (площадь под графиком спектра испускания) и вычитаем из нее значение комбинационного рассеяния воды (площадь под графиком спектра испускания воды): $(I - I_{\text{кр}})$. Полученную величину делим на значение оптической плотности D , взятое на длине волны возбуждения флуоресценции, и получаем коэффициент пропорции:

$$K = (I - I_{\text{кр}}) / D.$$

Так как флуоресцентная спектроскопия является более чувствительным методом чем спектроскопия поглощения, то зачастую для снятия спектров испускания была необходимость разбавлять исследуемые образцы в 10 раз. Чтобы

учесть это при расчете квантового выхода, мы предварительно делили значение оптической плотности на 10.

Величину квантового выхода находим по формуле:

$$\Phi = \Phi_{\text{xc}} K / K_{\text{xc}},$$

где $K_{\text{xc}} = 106352$ и $\Phi_{\text{xc}} = 0,55$ – значения коэффициента пропорции и квантового выхода для эталона (в нашем случае - хинин-сульфата).

Рассчитанное значение квантового выхода соответствует размеру (5×5) щели монохроматора. Для других размеров щели были получены коэффициенты пересчета, представленные в таблице:

	270	310	355
2*2; 5*2	<i>4</i>	<i>1.5</i>	<i>0.9</i>
5*5; 2*5	<i>18.6</i>	<i>7.8</i>	<i>4.7</i>

Такую процедуру расчета необходимо произвести для каждого значения длины волны возбуждения флуоресценции, после чего можно приступать к анализу полученных результатов.

2.2. Приготовление образцов культуральной жидкости микромицетов и растворов промышленных гуминовых препаратов для спектральных измерений

Для исследования типичных спектральных характеристик грибов и их влияние на трансформацию гуминовых веществ, нам были предоставлены 6 различных штаммов микромицетов: *Alternaria alternata*, *Fusarium moniforme*, *Phoma glomerata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Geomyces pannorum* и *Mycelia sterilia*, представленных на рисунке 3. Культуры грибов выращивали на жидкой среде Чапека с добавлением гумата калия из леонардита и без его внесения. Гумат перед автоклавированием вносили в среду Чапека навеской для достижения концентрации 0,2 г/л. Образцы выращивали в 200-мл стеклянных колбах на протяжении 14 суток в темноте при температуре 25°C. После этого с помощью фильтров «белая лента» культуральную жидкость отделяли от грибной биомассы и использовали для последующих спектральных исследований.

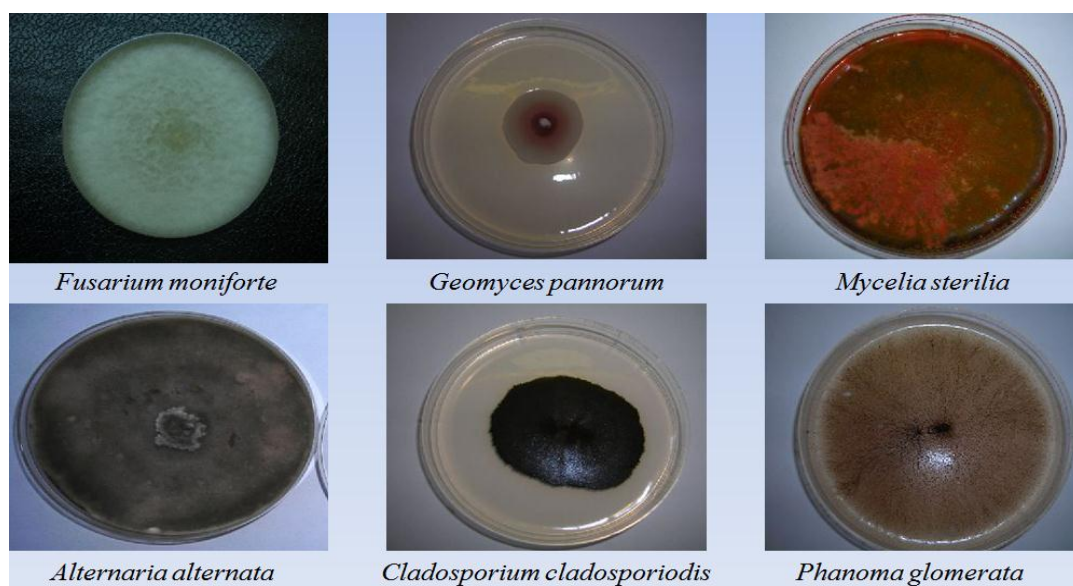


Рис. 3. Исследуемые культуры микромицетов с различной окраской мицелия на среде Чапека.

2.3. Молекулярные фракции природного растворенного органического вещества

Отбор проб природной пресной воды для дальнейших спектральных исследований производился 29.03.2010 из Москва-реки и реки Сетунь при температуре +3°C. Для разделения на фракции РОВ образцы проходили фильтрацию в 2 этапа. Сначала пробы пропускали через лавсановый мембранный микрофильтр МФ-200 с размером пор 200 нм (этот этап очищает воду от частиц взвеси, фрагментов клеток микроорганизмов и крупных молекул типа молекул белков). Затем вещество под давлением в атмосфере аргона пропусклось через ацетатцеллюлозный ультрафильтр УАМ-50 с размером пор 5 нм, изображенный на рис.4. Фракция, сконцентрированная над ультрафильтром, называется коллоидным органическим веществом, а фракция, прошедшая через последний фильтр, - низкомолекулярной фракцией. Фильтрация проб была осуществлена на кафедре рационального природопользования географического факультета МГУ.



Рис.4. Три ячейки ультрафильтра.

2.4. Добавление nanoалмазов в среду роста микромицета *Cladosporium cladosporioides*

В этой серии экспериментов нам была предоставлена культуральная жидкость темнопигментированного гриба *Cladosporium cladosporioides*, выросшего на питательной среде Чапека. Нашей задачей было исследовать спектральные характеристики чистых образцов и при добавлении в них nanoалмазов (НА). В данной работе использовались НА марки SDND водный коллоид (производитель PlasmaChem GmbH, Германия), не содержащие ПАВ и другие стабилизаторы. Характерный размер частиц 5-15 нм, зольность менее 0,4%, концентрация НА 0,005%.

Влияние частиц НА на развитие биомассы исследовали при посеве суспензии микроконидий в колбы с жидкой средой Чапека (объем среды - 100 мл). Суспензию микроконидий получали из пробирки смывом со скошенного агара Чапека. Инкубировали гриб в колбах при комнатной температуре на шейкере (130 об./мин.) в течение 10 суток. Эксперименты проводили в 3-х кратной повторности, данные обработаны статистически.

Как видно из рисунка 5, через две недели после внесения в культуральную жидкость микромицета nanoалмазов, образец приобрел светло-коричневый оттенок.



Рис.5. Фотография культуральной жидкости микромицета, выращенного на среде с добавлением nanoалмазов и без их внесения.

3. Экспериментальные результаты и их обсуждение

3.1. Спектры флуоресценции раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него

Флуоресценцию гуминовых веществ наблюдали в диапазоне 280-600 нм. На примере трех видов микромицетов (*Phoma glomerata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mycelia sterilia*) для каждой длины волны возбуждения представлены спектры испускания флуоресценции до и после внесения гуминового препарата. Черным цветом выделен характерный спектр раствора гумата, для которого максимум флуоресценции близок к 500 нм. Узкий пик в районе 295, 345 и 405 нм с точностью до шумов в спектре (при возбуждении соответственно на 270, 310 и 355 нм) соответствует КР воды. Для чистой культуры грибов (прерывистые линии на графике) наличие УФ полосы между 300-350 нм обусловлено свечением аминокислот, белковых и фенольных соединений. После добавления в пробу гумата типичные спектры состоят из двух широких перекрывающихся полос: все той же УФ полосы и синей люминесценции в области 425-470 нм. Вклад в эту полосу дают экзометаболиты микромицетов, а также гуминовые соединения в среде роста. Соотношение интенсивностей двух полос зависит от типа пробы.

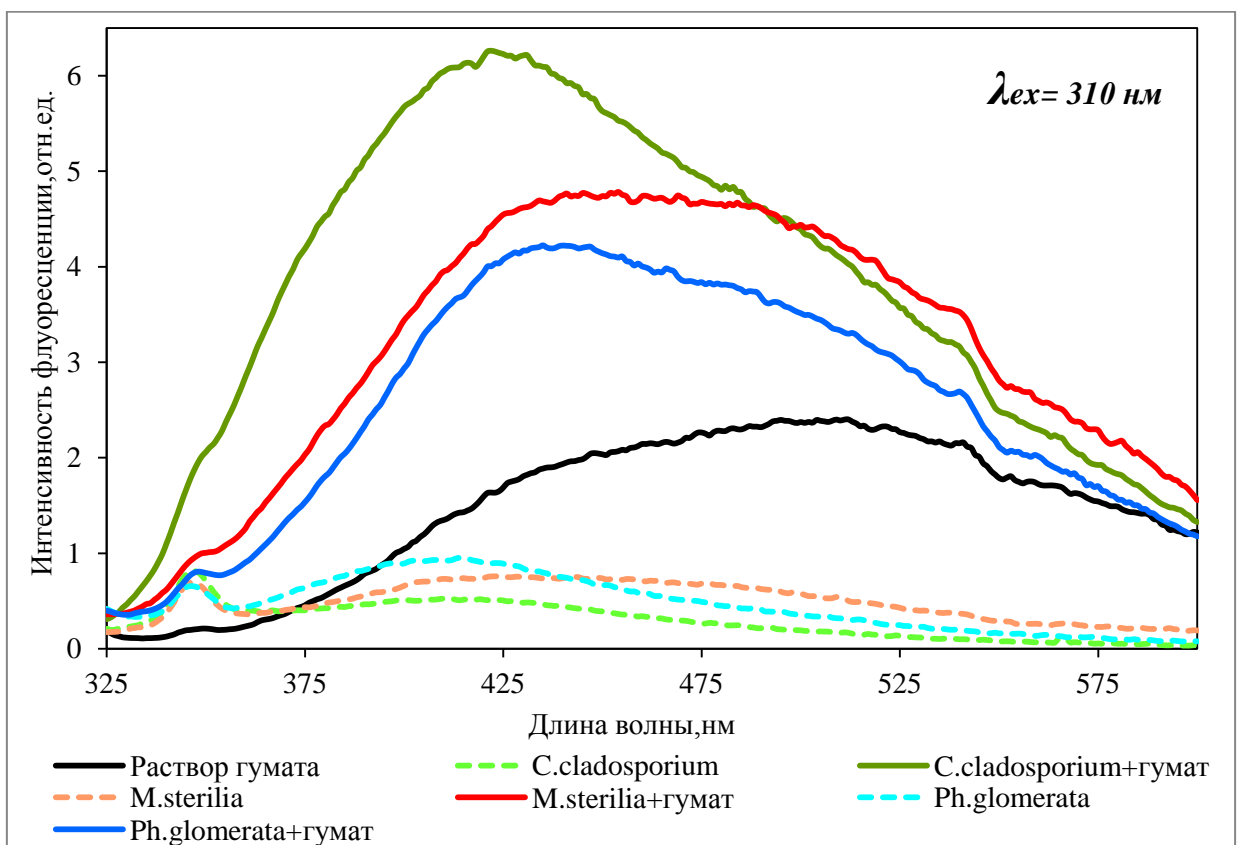
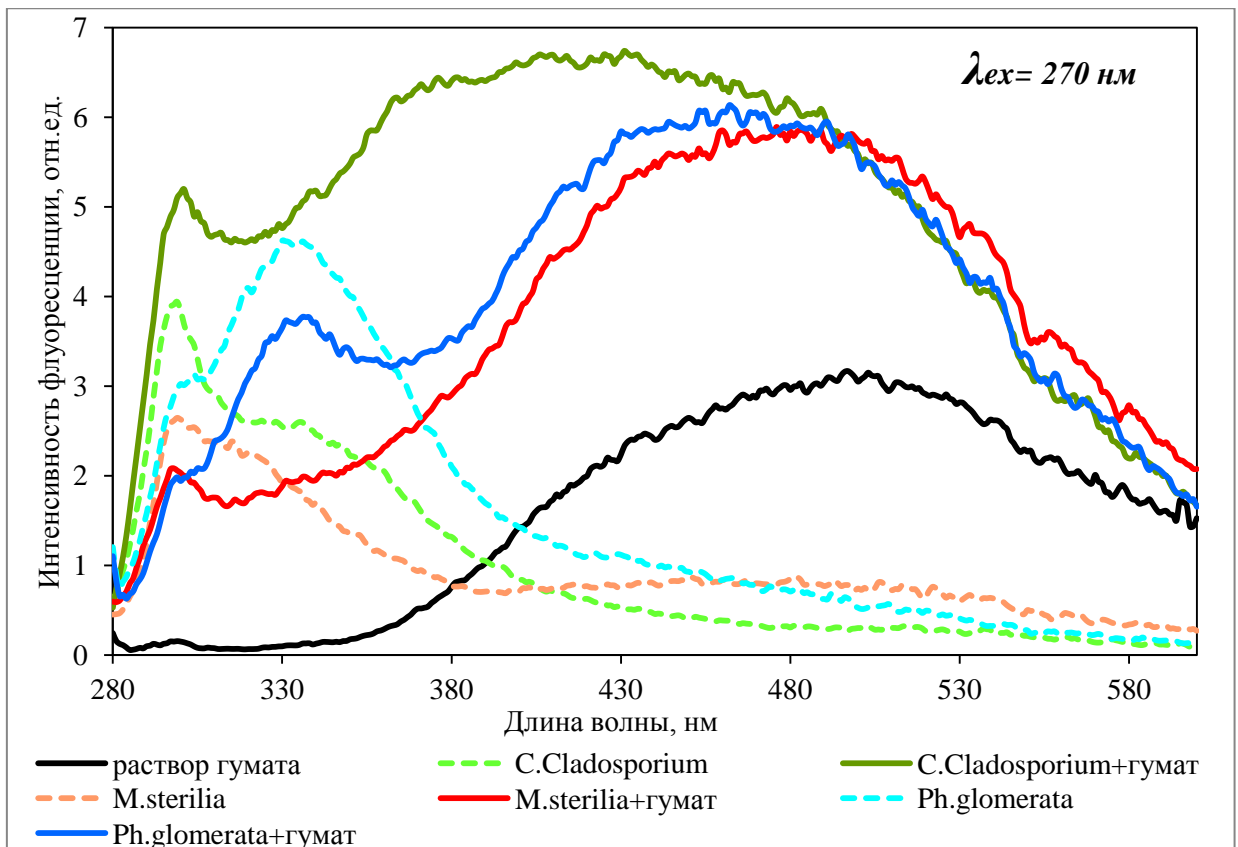


Рис. 6,7. Спектры флуоресценции раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него (длина волны возбуждения 270,310 нм).

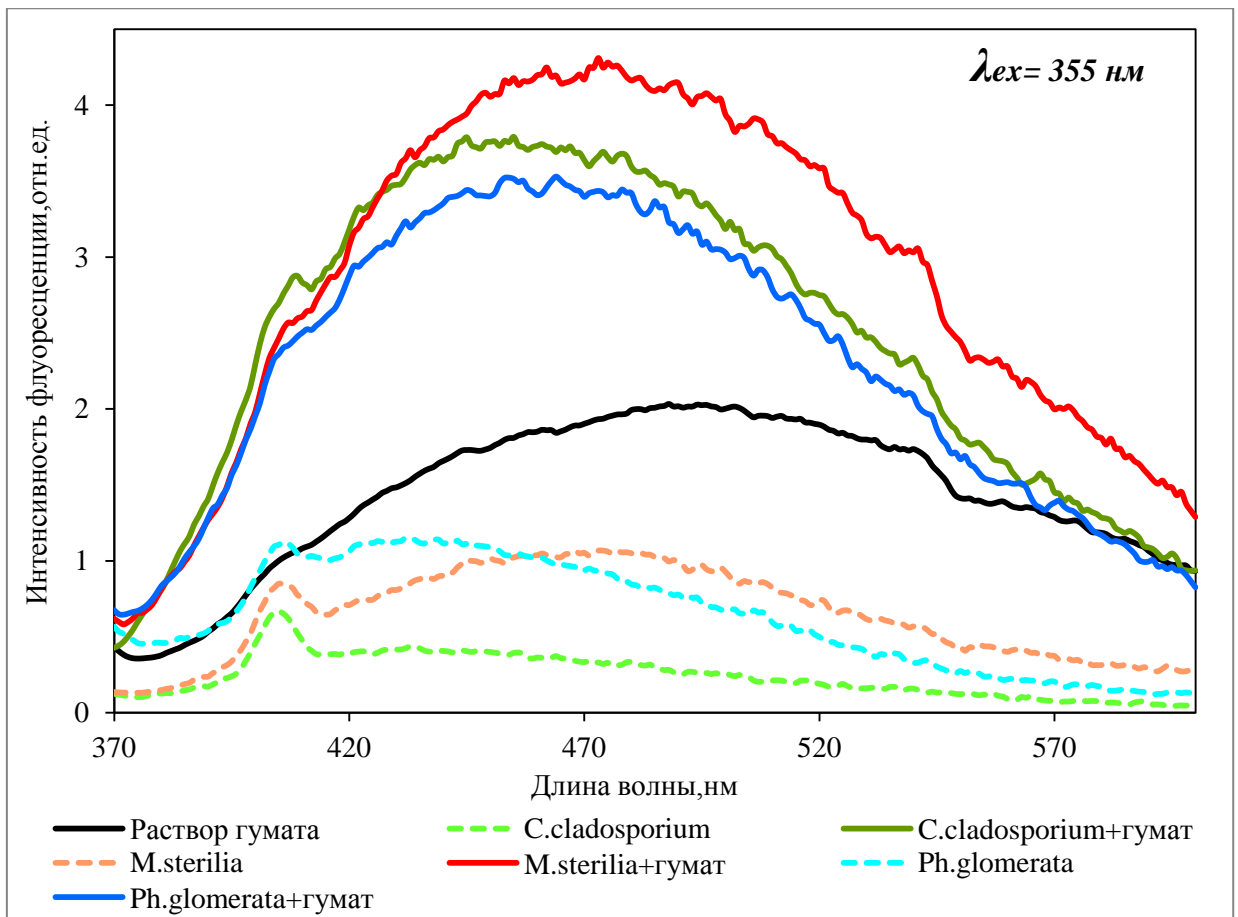


Рис. 8. Спектры флуоресценции раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него (длина волны возбуждения 355 нм).

3.2. Квантовый выход раствора гуминового препарата и проб культуральной жидкости микромицетов, выращенных с добавлением гуминового препарата и без него

После расчета квантового выхода и определения максимума длины волны испускания была составлена сводная таблица данных, в которой наглядно отображены полученные результаты.

	Название пробы						
	<i>Чанек+гумат</i>	<i>C.cladosporium</i>	<i>C.cladosporium</i> +гумат	<i>Ph.glomerata</i>	<i>Ph.glomerata</i> +гумат	<i>M.sterilia</i>	<i>M.sterilia</i> +гумат
Длина волны возбуждения, нм	Квантовый выход						
270	0.6%	2.4%	3.3%	1.3%	1.9%	1.5%	1.4%
310	0.5%	1.7%	5.2%	0.5%	1.9%	0.9%	2.1%
355	0.4%	5.0%	7.2%	1.0%	2.1%	2.3%	3.4%
	Максимум флуоресценции						
270	498	333	414	330	423	321	459
310	501	-	423	-	435	-	446
355	500	-	451	-	465	-	473

Рис. 9. Таблица спектральных характеристик для каждой из исследуемых проб в зависимости от длины волны возбуждения.

Как показали эксперименты, параметры флуоресценции раствора гуминового препарата после трансформации микромицетами значительно менялись относительно таковых для проб, не подверженных воздействию микроорганизмов [5]. Так, например, квантовый выход флуоресценции увеличился, а максимум длины волны испускания сместился в коротковолновую сторону по сравнению с исходным раствором. Более того, после роста микромицетов менялось спектральное поведение флуоресценции гуминовых веществ в зависимости от длины волны возбуждения λ_{ex} . Если раньше квантовый выход постепенно уменьшался с ростом λ_{ex} , то теперь он стал увеличиваться. Значение максимума длины волны испускания раствора гуминового препарата до трансформации микромицетами было одинаковым для всех трех значений λ_{ex} , после нее - стало зависеть от длины волны возбуждения.

Представленные выше результаты могут быть объяснены трансформацией гуминовых веществ микромицетами в процессе их роста. Данные микроорганизмы

видоизменяют макромолекулы с длинноволновым испусканием флуоресценции и создают меньшие молекулы с длиной волны испускания, сдвинутой в коротковолновую область. Зависимость значения квантового выхода и максимума интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждения отражает неоднородность структуры гуминовых веществ в питательной среде. Таким образом, спектральные характеристики гумата становятся схожими с подобными характеристиками природных органических соединений.

В подтверждение вышесказанному были поставлены опыты по сравнению гуминовых веществ, растворенных в природных водоемах, с промышленными гуминовыми кислотами. Отбор проб производился 29.03.2010 из Москва-реки и реки Сетунь, после чего проводились исследования исходных образцов и проб, разделенных с помощью фильтров на фракции. В качестве итога была составлена таблица сравнения характерных спектральных параметров.

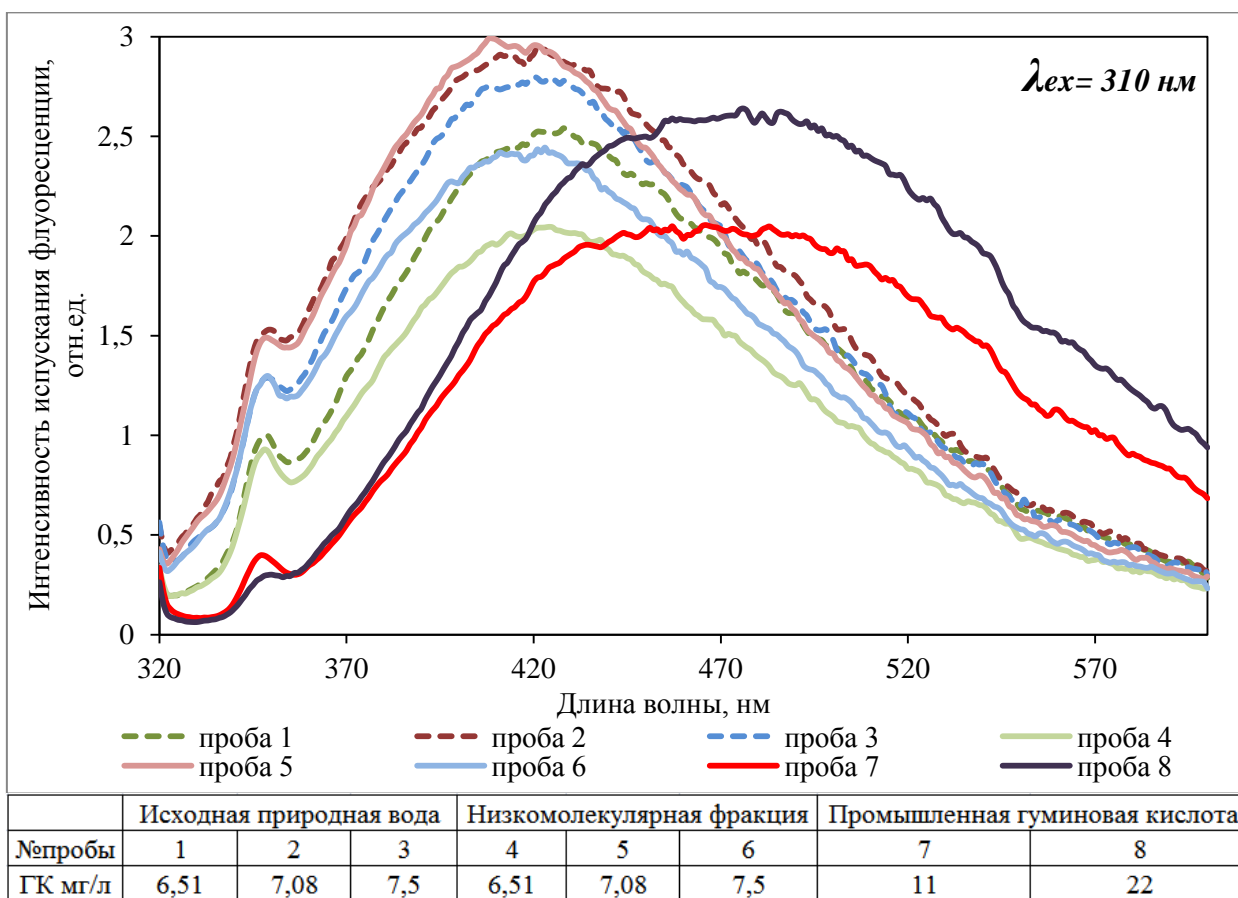


Рис. 10. Спектры испускания флуоресценции гуминовых веществ природной воды и промышленных гуминовых кислот (длина волны возбуждения 310нм).

	1	2	3	4	5	6	7	8
λ	квантовый выход							
270	1.8%	2.7%	2.6%	2.2%	4.0%	3.9%	1.3%	1.3%
310	2.5%	3.2%	3.4%	3.0%	4.8%	3.9%	1.2%	1.2%
355	3.6%	3.9%	5.0%	5.0%	7.2%	5.7%	1.0%	1.1%
	максимум испускания флуоресценции							
270	446	446	438	450	436	439	478	477
310	428	421	420	424	420	423	475	475
355	448	445	445	451	447	445	476	477

Рис. 11. Таблица данных по сравнению гуминовых веществ природной воды и промышленной гуминовой кислоты.

Как мы можем убедиться, длина волны испускания флуоресценции природных гуминовых веществ сдвинута в коротковолновую область, по сравнению с промышленными препаратами [20]. Для природной воды характерен так называемый «синий сдвиг» [21], заметный при сравнении спектров с возбуждением 270 и 310 нм, в то время как максимум испускания гуминовых кислот остается постоянным для всех длин волн возбуждения.

Квантовый выход гуминовых кислот с ростом длины волны возбуждения медленно уменьшается, в то время как для гуминовых веществ природной воды он увеличивается. Также квантовый выход низкомолекулярных фракций больше, чем у исходной природной воды, что доказывает возможность преобразования макромолекул гуминовых веществ в более мелкие под действием микромицетов в экспериментах, описанных выше.

3.3. Спектры поглощения и флуоресценции культуральной жидкости микроцета *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения

Флуоресценцию исследуемых образцов наблюдали в диапазоне 280-600 нм. Как уже говорилось, во всех спектрах присутствует узкая полоса КР воды, а также максимум испускания культуральной жидкости гриба *Cladosporium cladosporioides* в районе 330 нм ($\lambda_{ex}=270$ нм), характерный для аминокислот, белковых и фенольных соединений. Однако после добавления наноалмазов у проб появляется новая полоса флуоресценции на 460 нм, при этом полоса свечения белковых соединений уменьшается. Это может быть связано с тем, что в присутствии наноалмазов пигменты гриба - предположительно меланины - из биомассы переходят в культуральную жидкость, и это может быть выявлено по ее спектральным свойствам. Эти различия между образцами хорошо заметны как в спектрах флуоресценции, так и в спектрах поглощения для всех трех повторностей.

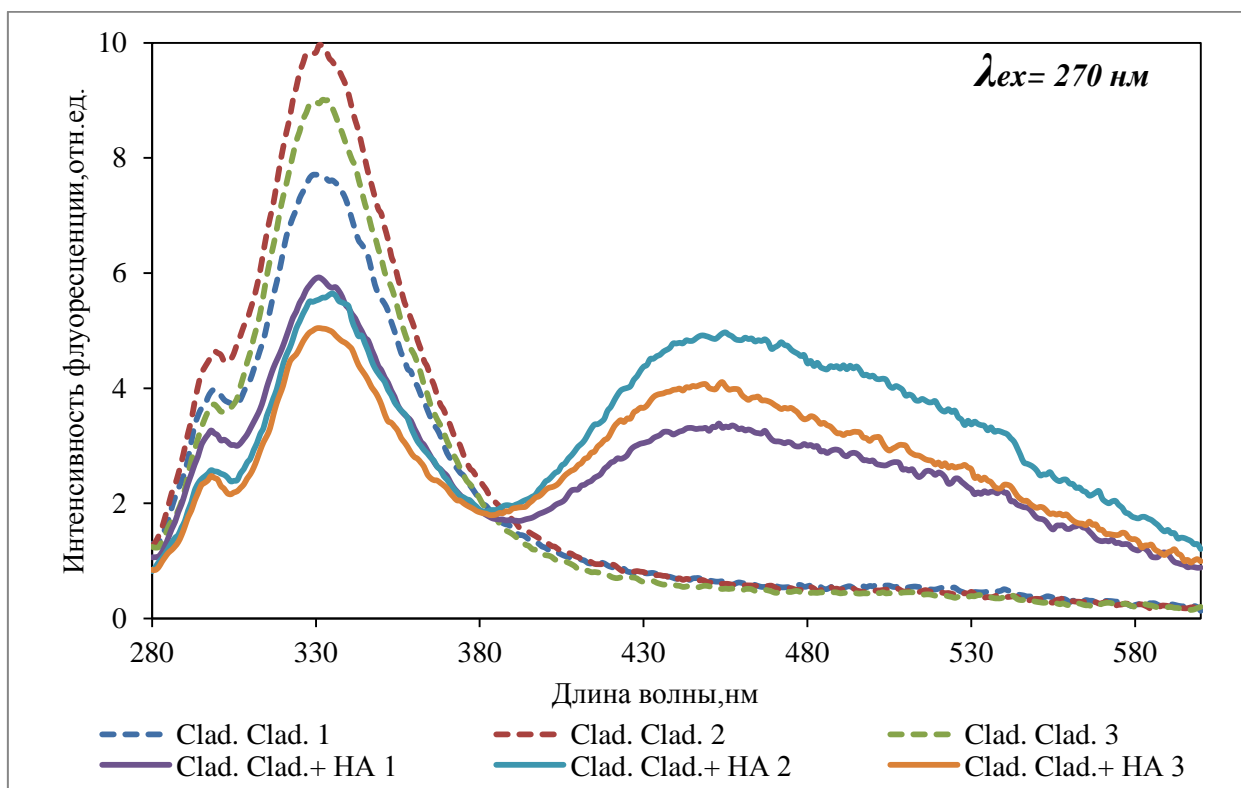


Рис. 12. Спектры испускания флуоресценции культуральной жидкости гриба *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения (длина волны возбуждения 270 нм).

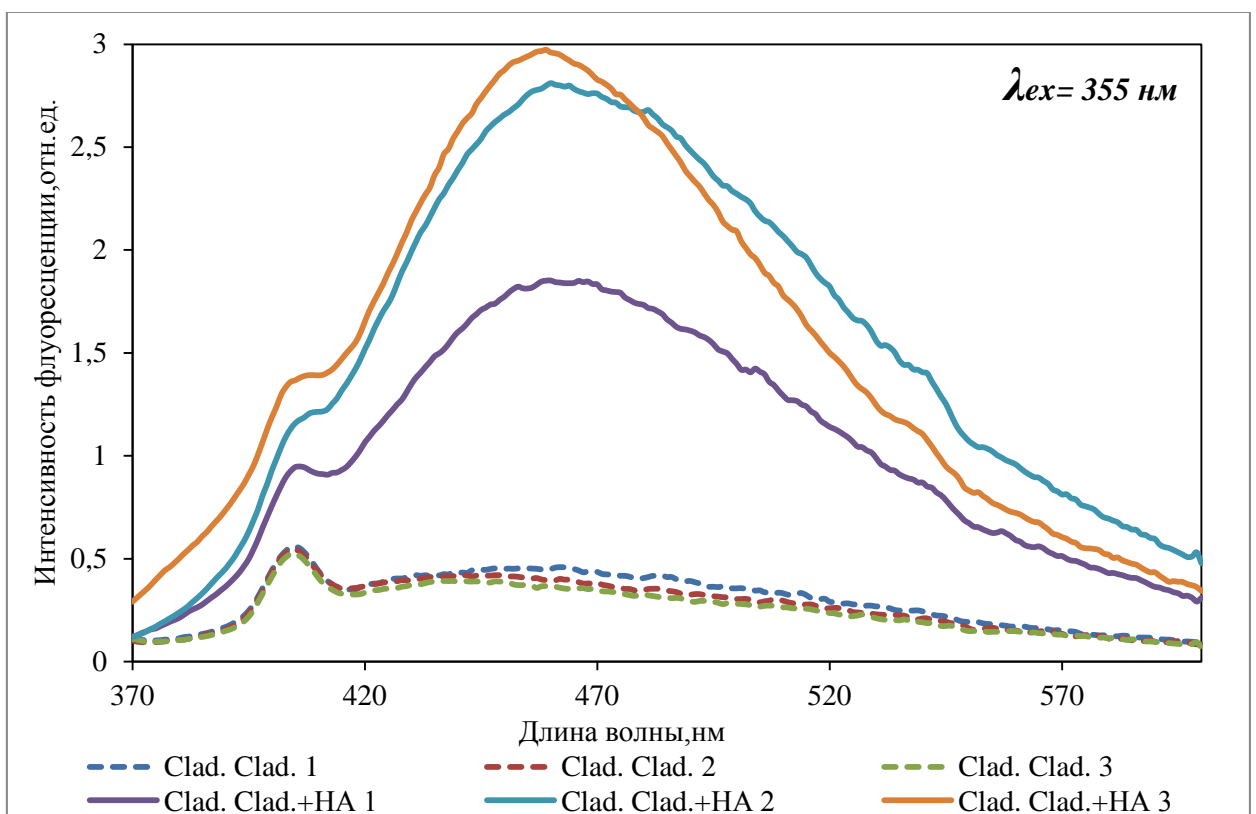
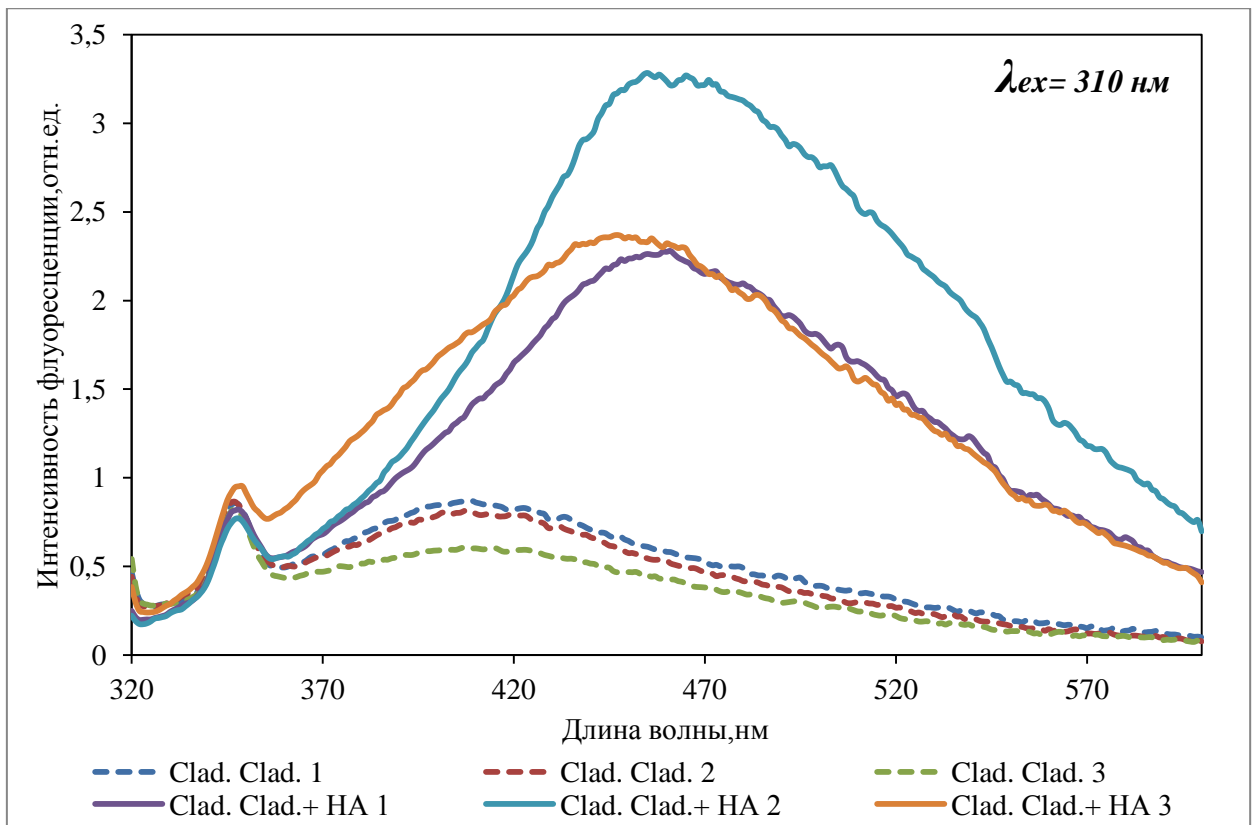


Рис. 13,14. Спектры испускания флуоресценции культуральной жидкости гриба *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения (длина волны возбуждения 310, 355 нм).

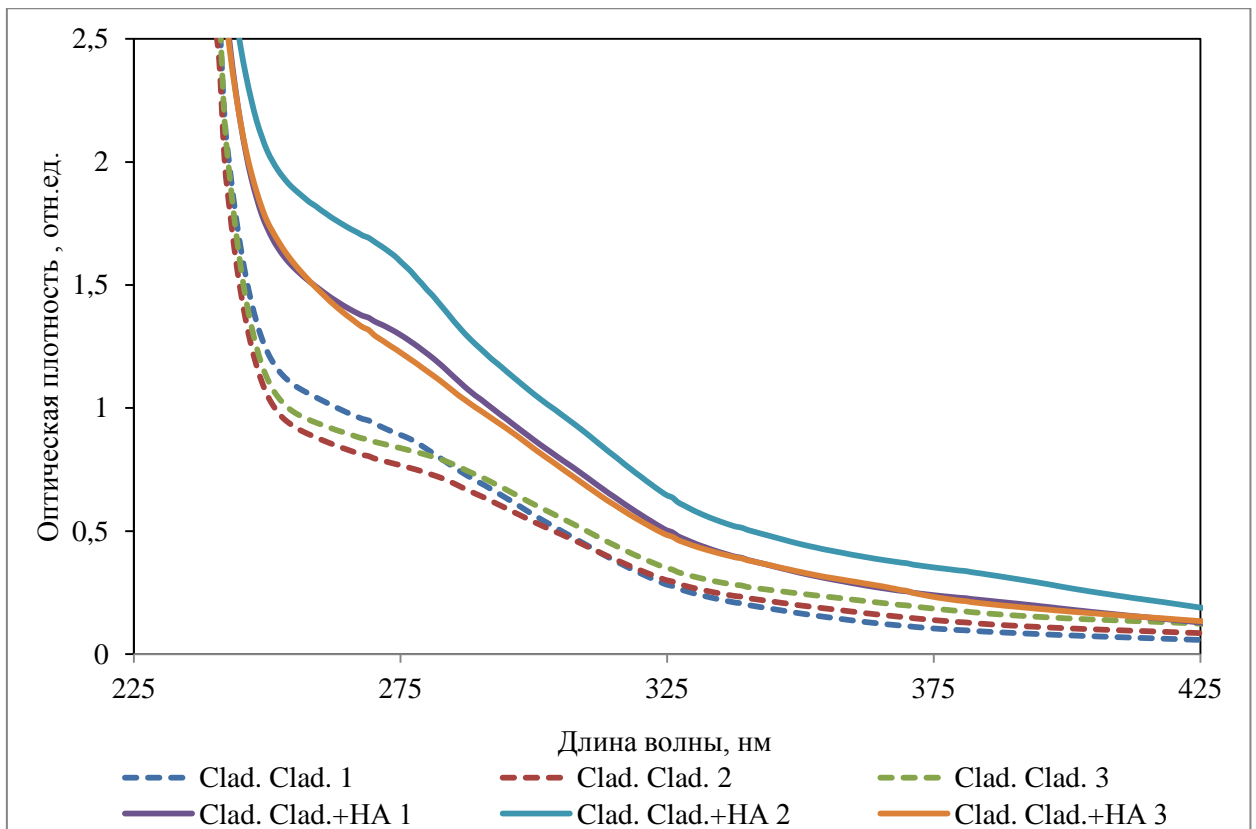


Рис. 15. Спектр поглощения культуральной жидкости *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения.

3.4. Квантовый выход культуральной жидкости микроцета *Cladosporium cladosporioides* с добавлением наноалмазов и без их внесения

Так как подобные исследования по влиянию наноалмазов на культуральную жидкость микроцетов проводились впервые, мы не знали диапазон значений оптических плотностей и интенсивностей флуоресценции. Поэтому для дальнейших расчетов спектральных характеристик были сняты спектры поглощения для изначальных образцов и проб, разбавленных в 10 раз. Значения квантового выхода для обоих вариантов приведены в таблице.

	Clad. Clad. 1	Clad. Clad. 2	Clad. Clad. 3	Clad. Clad.+ HA1	Clad. Clad.+ HA 2	Clad. Clad.+ HA 3
λ	квантовый выход (D неразбавленный)					
270	3.2%	4.5%	3.6%	3.2%	3.2%	3.4%
310	1.4%	1.3%	0.9%	2.4%	2.8%	2.8%
355	2.1%	1.5%	1.1%	3.8%	4.3%	5.7%
	квантовый выход (D разбавленный)					
270	3.0%	3.9%	3.4%	3.2%	3.1%	3.3%
310	1.3%	1.1%	0.8%	2.4%	2.7%	2.7%
355	2.0%	1.4%	1.1%	3.9%	4.2%	6.2%
	максимум флуоресценции					
270	330	331	332	332, 451	335, 453	331, 454
310	-	-	-	461	455	446
355	-	-	-	460	460	459

Рис. 16. Таблица спектральных характеристик для каждой из исследуемых проб в зависимости от длины волны возбуждения.

Как мы могли наблюдать, при выращивании микроцетов в среде с добавлением наноалмазов у проб появляется новая полоса свечения на 460 нм, положение максимума испускания которой и квантовый выход отличаются от типичных значений для культур без внесения НА. В ранее проводимых опытах для питательной среды с наноалмазами, но без добавления грибов, было показано, что сами они не могут давать наблюдаемые полосы поглощения и свечения. Следовательно, при добавлении наноалмазов в среду выращивания микроцеты выделяют новые продукты – метаболиты, различимые нашими спектральными методами. Скорее всего, это вещества типа темноокрашенных природных пигментов - меланинов, отвечающих за черную или коричневую окраску грибов и

животных. В дальнейшем мы планируем поставить эксперименты по исследованию этого вопроса, однако уже сейчас можно выделить ряд интересных фактов. В наших экспериментах было обнаружено, что для пигментов микромицета отсутствует так называемый «синий сдвиг» спектров флуоресценции, характерный для природных гуминовых веществ (у промышленных гуматов его нет). Зато, в отличие от гуминовых препаратов, квантовый выход флуоресценции пигментов гриба увеличивается с ростом длины волны возбуждения (как и для природных гуминовых веществ). То есть по спектральным свойствам пигменты гриба, выделяемые в присутствии наноалмазов, в чем-то похожи на природные гуминовые вещества, а в чем-то - на промышленные гуматы.

3.5. Основные результаты главы I

В работе были получены спектры поглощения и флуоресценции различных штаммов микромицетов как в чистом виде, так и при добавлении в культуральную жидкость гуминовых веществ и наноалмазов. Для каждой из проб были рассчитаны такие спектральные характеристики, как квантовый выход флуоресценции и максимум длины волны испускания. На основании полученных данных сделаны следующие выводы:

- При сравнении результатов для спектральных характеристик природных и промышленных гуминовых веществ было выявлено, что для гуминовых кислот квантовый выход с ростом длины волны возбуждения уменьшается, в то время как для гуминовых веществ, растворенных в природной воде, он увеличивается. При этом длина волны испускания флуоресценции последних сдвинута в коротковолновую область и наблюдается «синий сдвиг» спектров, отсутствующий у промышленных гуминовых препаратов.
- Из проведенных экспериментов по исследованию влияния гуминовых веществ на культуральную жидкость грибов можно сделать вывод, что в

процессе двухнедельного роста на среде с гуминовым препаратом, микромицеты преобразуют его таким образом, что флуоресцентные характеристики гумата становятся схожими с подобными характеристиками природных гуминовых веществ (растворенных в воде или почвенных экстрактах органических веществ), то есть максимум флуоресценции смещается в коротковолновую область и проявляется неоднородность структуры.

- При добавлении в культуральную жидкость гриба *Cladosporium cladosporioides* наноалмазов, микромицеты выделяют новые продукты – метаболиты, с характерной полосой свечения в районе 460 нм. Вероятнее всего, это вещества типа меланинов – пигментов, отвечающих за черную или коричневую окраску грибов и животных, имеющих схожие спектральные характеристики как с природными гуминовыми веществами, так и с промышленными гуминовыми препаратами.

Глава II. Спектральные методы оценки концентрации клеток водорослей в суспензиях с коррекцией на светорассеяние

Введение

В настоящее время при проведении биологических исследований для определения численности клеток фотосинтезирующих микроорганизмов чаще всего применяется подсчёт клеток на специальных счётных стёклах под микроскопом [25]. Как правило, такой подсчёт является длительным и трудоёмким процессом. В то же время спектральные методы отличаются быстротой, высокой чувствительностью и возможностью их применения без разрушения объекта исследования [26-29]. Именно поэтому весьма актуальной является разработка методов диагностики биологических объектов *in situ* и *in vivo*, а их применение – важным для решения многих экологических задач. Так, например, существует метод определения физиологического состояния зелёных растений и водорослей по спектрам флуоресценции хлорофилла *in vivo* [26].

Целью данной работы является разработка методики оценки численности клеток по спектрам поглощения и люминесценции водорослей, измеренным с использованием стандартных спектральных приборов в условиях существенного светорассеяния без какой-либо предварительной обработки суспензии. Объектами исследования были выбраны два типа зелёных водорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda*, которые часто используются как тест-объекты при проведении биотестирования проб воды и почвы на общую токсичность [33-34].

1. Обзор литературы

1.1. Трудности спектрального анализа биологических объектов

Биологические объекты, предназначенные для спектрального анализа, находятся в конденсированной фазе (биологические ткани, жидкости). В то же время технически и методически наиболее удобно проводить исследования истинных растворов. Потому обычно стараются перевести исследуемое вещество в раствор. Однако при таком подходе изменяется характер спектральных проявлений межмолекулярного взаимодействия (ММВ) и, следовательно, искажается информация об исследуемом объекте. Эти искажения должны быть учтены в методике проведения конкретного анализа. Кроме того, в случае биологического объекта подобное преобразование среды возможно провести только “in vitro” (т.е. на неживом объекте). Между тем при переходе от живого объекта “in vivo” к состоянию “in vitro” исчезают процессы внутриклеточного преобразования веществ и их трансмембранного обмена с окружающей средой, характерные для живого организма. Это приводит к изменению количественного и качественного состава исследуемого вещества.

Например, известно, что спектральные характеристики пигментов (это касается не только интенсивности, но также расположения спектральных полос) в экстрактах и в составе хлоропласта заметно различаются. Так, при переходе из раствора в ацетоне к нативному хлорофиллу происходит длинноволновый сдвиг полос поглощения Хл *a* - на 12 нм., Хл *b*- на 6 нм., Хл *c*- на 6 нм. Это приводит к различиям в положении максимума полосы поглощения пигментов клеток и их экстрактов. В ацетоновых экстрактах λ_{max} находится в районе 662-665 нм, а для клетки в области 675 нм. В то же время эксперименты показывают, что величины сдвигов спектральных полос пропорциональны удельным показателям поглощения пигмента, которые для хлорофиллов *a, b, c* равны соответственно 88,15; 51,3; 42,6 л/(г * см). Эти результаты говорят о преобладающей роли динамических ММВ в исследованных системах. В спектрах флуоресценции этих систем максимум полосы флуоресценции хлоропласта находится при $\lambda = 685$ нм, что отличается от

измеренного значения в спектре экстракта хлорофилла в ацетоне ($\lambda=673$ нм), где резонансные ММВ практически отсутствуют.

Несмотря на успешное развитие методов спектрального анализа биологических объектов, изучение их спектральных свойств встречает ряд трудностей [30-31]. Некоторые из них связаны со специфическими оптическими свойствами биологических сред. Существуют различные аппаратурно-методические приемы для преодоления сильного рассеяния, слишком большой или, наоборот, слишком малой величины оптической плотности, светочувствительности образца. Они основаны на применении стандартной и специально разработанной аппаратуры [31]. Влияние светочувствительности образца снижают использованием низкоинтенсивных источников излучения и соответственно высокочувствительных фотоприемников (фотоумножителей) в составе высокоскоростных спектрометров. Для уменьшения влияния светорассеяния на результаты фотометрирования пользуются интегрирующими сферами, располагаемыми непосредственно за образцом и собирающие рассеянное излучение, компенсирующими светорассеяние матовыми пластинками.

Для регистрации больших оптических плотностей используют методы отражения, нарушенного полного внутреннего отражения и др. В ряде случаев светорассеяние частично снижается добавлением к объекту веществ, увеличивающих показатель преломления среды (сахарозы, глицерина), что приводит к уменьшению разницы показателей преломления раствора и содержащихся в нем рассеивающих частиц (митохондрий, хлоропластов, форменных элементов крови, клеток водорослей или бактерий и др.). В некоторых случаях удается внести поправки на светорассеяние путем экстраполяции показателя поглощения из спектральной, где оно практически отсутствует, в исследуемую область, где поглощение велико. Но эти методы, позволяющие в определенной мере учесть перечисленные особенности биологических сред, далеко не полностью исчерпывают его специфику.

Основной отличительной особенностью биологических сред по сравнению с модельными истинными растворами и однокомпонентными жидкостями является их неоднородный характер, обусловленный клеточным строением живой материи. Он выражается в различном качественном и количественном составе внутри- и

межклеточной среды. Следствием этого являются пространственные изменения ряда локальных оптических характеристик биообъекта (показатель поглощения и показатель преломления) с характерным масштабом, соответствующим размеру клетки.

В спектр биологического объекта, представляющего собой многокомпонентную систему, вносят вклад различные химически индивидуальные компоненты. Каждый компонент системы может находиться в различных модификациях, отличающихся своими спектральными свойствами (количеством полос, их интенсивностью, полушириной и положением в спектре). Вследствие указанных причин измеряемая спектральная кривая представляет собой результат наложения (суперпозиции) спектров многих компонентов и обычно имеет сложную форму. При этом максимумы, характерные для индивидуальных компонентов системы, могут либо вообще не обнаруживаться на суммарной кривой, либо проявляться в виде слабовыраженных выступов, "плеч", перегибов и т.п.

Из-за сложного характера суперпозиции отдельных полос на суммарной кривой могут иногда проявляться так называемые "ложные" максимумы, которые не соответствуют ни одному из реальных компонентов исследуемой биологической системы. Отсюда следует, что задача точной идентификации компонентов и их количественного определения в биологической среде достаточно сложна. Для их решения аппаратно-методическими средствами необходимо разложение исходного спектра на составляющие (или расчет вклада каждого из веществ в спектр при различных длинах волн), как правило, с использованием информации о спектральных характеристиках таких компонентов.

1.2. Фотосинтетический аппарат клеток водорослей

Фотосинтез является основой существования жизни на Земле, занимая центральное место в круговороте вещества и энергии. Благодаря этому сложному процессу углерод становится доступным для организмов, а в атмосферу выделяется кислород, причём эта реакция является единственным источником кислорода на Земле. Фотосинтез осуществляют высшие растения, водоросли и некоторые виды бактерий. Суммарный процесс фотосинтеза включает в себя две взаимосвязанные стадии: световую и темновую [35]. В световой стадии происходит поглощение света пигментами, миграция энергии электронного возбуждения к реакционным центрам (РЦ), перенос электронов по цепи электронного транспорта и сопряжённые с ним процессы. Как в зелёных растениях, так и в водорослях все световые и часть темновых стадий фотосинтеза протекают в субклеточных частицах – хлоропластах, имеющих высокоупорядоченную внутреннюю структуру (рис.1).

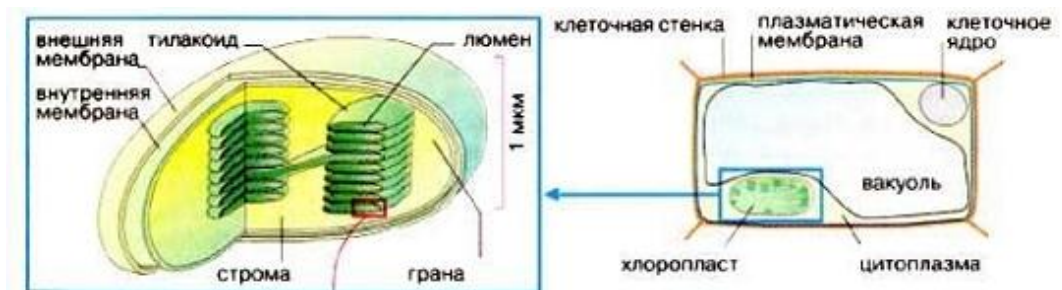


Рис.1. Строение клетки.

В высших растениях хлоропласты имеют цилиндрическую форму длиной примерно 5-10 мкм и диаметром 0,5-2 мкм [36]. Внутри хлоропласта находится строма, в которой протекают темновые стадии фотосинтеза, и ламеллярная система, образованная мембранами тилакоидов. В ней происходят световые стадии фотосинтеза. Различают тилакоиды гран, которые уложены в стопки, и тилакоиды стромы, являющиеся продолжением тилакоидов гран. На один хлоропласт приходится 40-80 тилакоидов гран. В одном тилакоидном диске функционируют в среднем 200 цепей электронного транспорта и находится 10^5 - 10^6 молекул пигментов.

Хлоропласты водорослей имеют некоторые особенности. Они чрезвычайно разнообразны по форме, размерам, числу в клетке, организации тилакоидов и по цветовой гамме, определяемой пигментным составом. Клетки водорослей содержат или один хлоропласт, или несколько: от двух до трёх десятков (50-80 в молодых и 200-300 в старых) [37]. Из разных видов водорослей наиболее близки по своей структуре к высшим растениям зелёные водоросли. У них, в отличие, например, от красных, образуются пачки из двух-шести и более тилакоидов, упакованные в граноподобные образования.

Основную роль в процессах фотосинтеза играют системы пигментов, являющиеся первичными акцепторами энергии, осуществляющими её дальнейшее преобразование. Основными фотосинтетическими пигментами являются хлорофиллы (*a, b, c, d, e*), каротиноиды и фикобилины. Все фотосинтезирующие организмы, от бактерий и водорослей до высших растений, содержат в качестве универсального пигмента хлорофилл *a* (Хл *a*). Хл *a* является основным флуоресцирующим веществом у растений. Свет может поглощаться либо непосредственно молекулами хлорофилла, либо вспомогательными пигментами, которые передают 80-100% поглощённой ими световой энергии. Молекула хлорофилла *a* обладает комплексом физико-химических свойств, необходимых для выполнения функций поглощения и преобразования энергии в фотосинтезе. Максимум поглощения Хл *a* в органических растворителях 660-664 нм. В высших растениях и в зелёных водорослях, кроме того, присутствует дополнительный пигмент – хлорофилл *b*. Максимум поглощения сдвинут в более коротковолновую область (в ацетоне, спирте) – 645 нм [38]. В талломах морских зелёных водорослей отношение Хл *a*/Хл *b* составляет около 1,5-2,2 вместо 3 у высших растений.

Форма, число и структура хлоропластов в клетке связаны с условиями роста и существования клеток водорослей. При длительном истощении в темноте в клетках *Chlorella* хлоропласт уменьшается, а митохондрии увеличиваются в размере, появляются крупные вакуоли [39]. У *Euglena* в темноте тилакоиды теряют упорядоченность, набухают и вакуолизируются, затем разрушаются сами хлоропласты, хотя полной деструкции не наступает. У *Chlorella pyrenoidosa* типичная структура гран проявляется при культивировании на среде только с низким (0,03%) содержанием CO₂ [37].

При поглощении квантов света перенос электрона последовательно осуществляется двумя фотосистемами (ФС) (рис.2): ФС2, поглощающей свет с $\lambda < 690$ нм, и длинноволновой ФС1, поглощающей свет с $\lambda < 710$ нм.

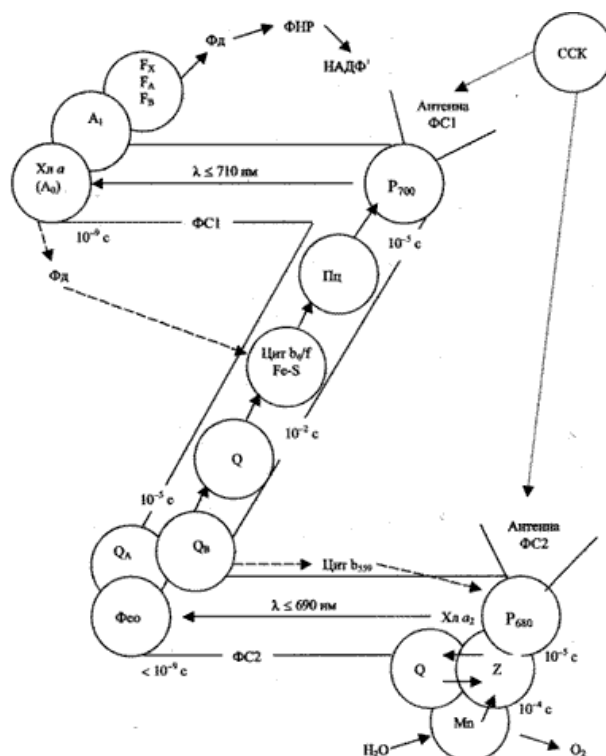


Рис.2. Z-схема фотосинтеза.

Каждая ФС представляет собой обособленную структуру ламеллярной мембраны. Большие хлорофилл-белковые субъединицы реакционного центра (РЦ) функционируют как антенны – с максимумом флуоресценции при 686 нм и как фотохимический центр – с максимумом флуоресценции при 695 нм. К настоящему времени проведено достаточно большое количество исследований, связанных с устройством фотосинтетического аппарата [40-42] и функционированием фотосинтетической системы растений [42-44]. Комплексы каждой из ФС имеют как собственные хлорофилльные антенны (20-40 молекул Хл *a*), так и периферические, образованные светособирающим комплексом (ССК). В ССК сосредоточена примерно половина находящегося в хлоропластах Хл *a* и практически весь Хл *b* [45]. Количество хлорофилла и соотношение его форм зависит от условий выращивания или обитания. Наблюдения за изменениями содержания хлорофиллов *a* и *b* в процессе роста растения показывают, что сначала формируются ФС1 и ФС2, а затем светособирающий комплекс; различные формы

хлорофилла *a* последовательно встраиваются в мембраны. В свою очередь, образование реакционных центров ФС2 происходит на более поздних этапах формирования электрон-транспортных цепей хлоропластов, чем РЦ ФС1.

Кроме хлорофилла, функции фоторецепторов выполняют вспомогательные пигменты растений и водорослей – каротиноиды и фикобилипротеины. Каротиноиды, кроме того, передают дополнительную энергию хлорофиллу (в зелёных водорослях с эффективностью ~50%), установлено их участие в защите клеток от фотоокисления и в процессах выделения кислорода. Они имеют максимум поглощения света в более коротковолновой области спектра (450-500 нм), чем хлорофиллы. Каротиноиды часто маскируют зелёный цвет хлорофиллов, окрашивая клетки в различные оттенки желтоватых и коричневатых тонов. Фикобилипротеины также выполняют важную функцию улавливания света, недоступного хлорофиллам (545-675 нм). Форма спектров поглощения и флуоресценции специфична для зелёных, красных и бурых морских водорослей, так как определяется их пигментным составом.

Поскольку спектры поглощения и спектры флуоресценции клеток растений зависят от строения и состояния фотосинтетического аппарата, для анализа его физиологического состояния используют спектральные методы [47]. Многочисленные внешние факторы (большие перепады температур, соли тяжёлых металлов, избыточная освещённость и др.) могут привести к необратимым изменениям фотосинтетического аппарата растений и водорослей. Наиболее чувствительным в этом отношении является ФС2, ответственная за разложение воды и выделение кислорода. В клетке в основном флуоресцирует хлорофилл ФС2. Поэтому именно изменения его флуоресценции говорят о состоянии реакционных центров этой фотосистемы. Например, среди тяжёлых металлов, поступающих в окружающую среду с промышленными стоками, одним из наиболее фитотоксичных является медь [48], блокирующая транспорт электронов на разных участках электронтранспортной цепи. Также было установлено, что под влиянием данного токсиканта у *Chlorella vulgaris* на свету происходило увеличение доли неактивных РЦ ФС2 за счёт замедления репарационных процессов.

Величина флуоресценции хлорофилла зависит так же и от того, в каком состоянии находятся РЦ – открытом (рабочем) или в закрытом. В открытом

состоянии бóльшая часть поглощённой энергии используется в процессе фотосинтеза. Поэтому интенсивность флуоресценции в клетке меньше, чем в растворе. Существуют различные механизмы тушения флуоресценции [43]. В экстремальных условиях, даже в клетке, флуоресценция может возрасти за счёт нарушения согласованной работы элементов цепи электронного транспорта. Например, в условиях повышенной освещённости или при добавлении некоторых веществ, ингибирующих поток электронов [38,41].

К настоящему времени для количественной оценки формы спектра используются различные параметры. Так, например, введён параметр ω [28], равный отношению интенсивностей длинно- и коротковолновой полос флуоресценции хлорофилла с максимумами соответственно 730 и 680 нм: $\omega = F_{730}/F_{680}$. На большом числе объектов показано, что величина параметра ω является интегральным показателем физиологического состояния и фотосинтетической активности растения. Похожий флуоресцентный параметр – отношение интенсивностей флуоресценции на 740 и 685 нм - используется для оценки содержания хлорофилла в листьях дерева гингко [50].

Методы биомониторинга позволяют определять интенсивность и качество реакций живых организмов на изменение среды обитания [28]. В природных водоёмах различные антропогенные загрязнения могут оказать угнетающее воздействие на фотосинтетический аппарат водорослей, что приведёт к уменьшению продуктивности всей водной экологической системы.

2. Экспериментальная часть

2.1. Объекты и методы

Культуры водорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda* были выращены и предоставлены для измерений сотрудниками лаборатории экотоксикологического анализа почв Факультета Почвоведения МГУ им. М.В.Ломоносова. Максимальная концентрация водорослей в экспериментах составляла 41,3 млн клеток/мл для *Chlorella vulgaris* и 1,97 млн клеток/мл для *Scenedesmus quadricauda*. Культуры водорослей разбавлялись питательной средой для получения образцов с различной концентрацией клеток.

Спектральные измерения проводились на флуориметре CM 2203 и спектрофотометре Unicо в стандартных кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Спектры оптической плотности суспензий клеток измерялись по отношению к питательной среде.

2.2. Спектры оптической плотности суспензии клеток

Типичные спектры оптической плотности суспензий клеток водорослей приведены на рис. 3-4, которые наглядно демонстрируют необходимость учёта светорассеяния при использовании величины оптической плотности суспензии для метода количественной диагностики водорослей. На спектрах оптической плотности суспензий клеток видны не только полосы поглощения света пигментами водорослей (каротиноидов в спектральной области 400-550 нм и хлорофилла в области 650-700 нм), но и превалирующее по величине в спектре и уменьшающееся с ростом длины волны светорассеяние.

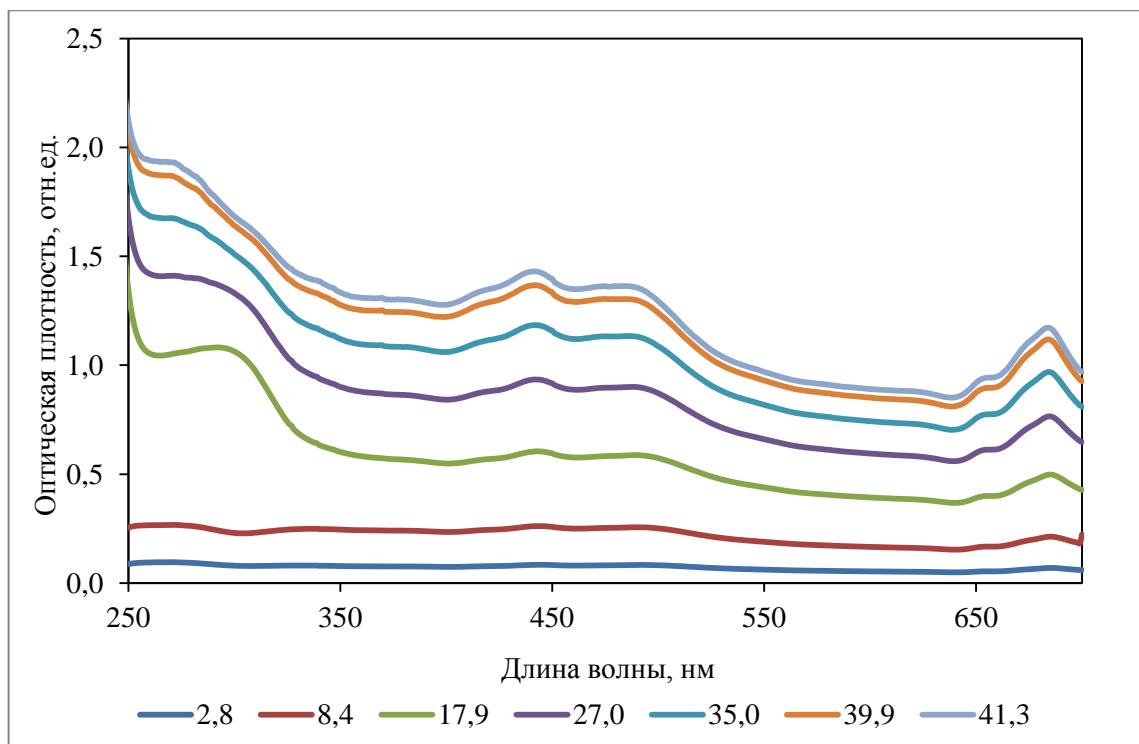


Рис.3. Спектры оптической плотности суспензии клеток культуры *Chlorella vulgaris* различной концентрации. Концентрации клеток приведены в млн/мл.

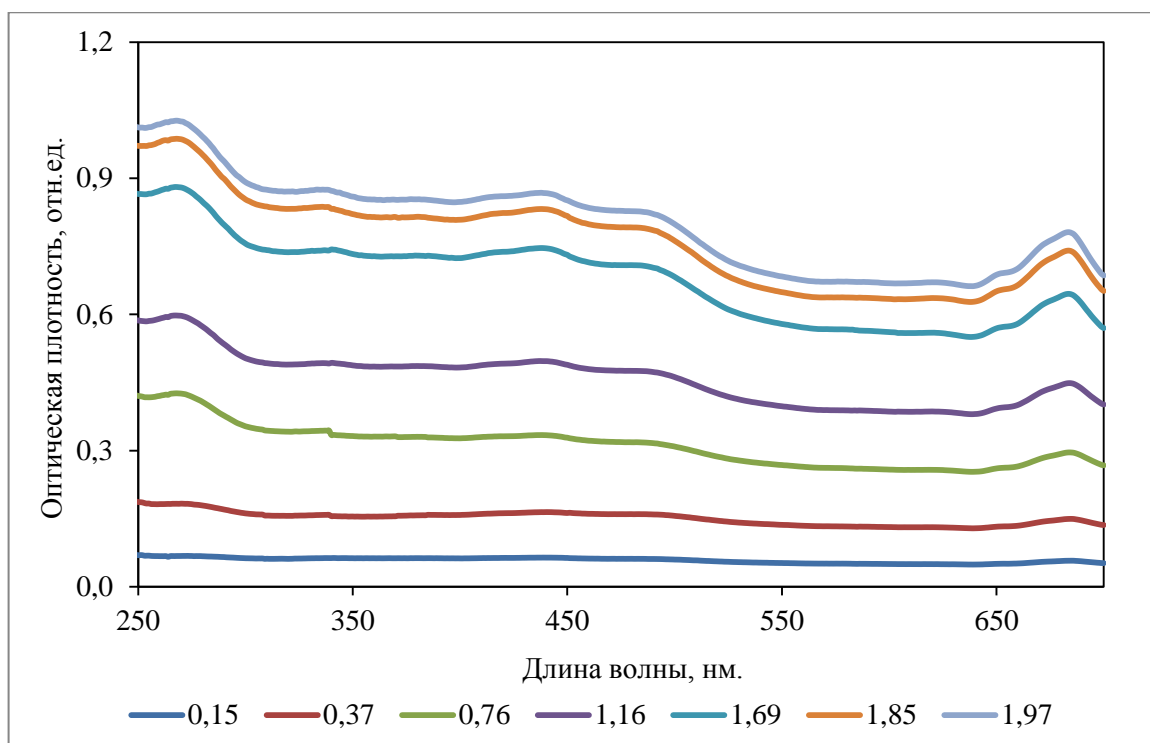


Рис.4. Спектры оптической плотности суспензии клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* различной концентрации. Концентрации клеток приведены в млн/мл.

Визуально можно оценить, что относительный вклад светорассеяния в общую величину оптической плотности больше для культуры *Scenedesmus quadricauda*, чем для *Chlorella vulgaris*. Это связано с тем, что клетки *Scenedesmus* крупнее, чем клетки *Chlorella*.

Для разработки алгоритма оценки численности клеток необходимо найти оптимальный метод учёта «пьедестала» в спектре, возникающего в результате рассеяния света на клетках культуры водоросли. При подборе функции для аппроксимации «пьедестала» использовали значения той части спектра, в которой не проявляется поглощение пигментов (соответственно 350-370 нм и 530-640 нм). В результате проверки различных аппроксимирующих функций установлено, что для спектров такого вида наиболее подходящей является квадратичная функция (рис. 5). Однако для рутинной обработки спектров поглощения можно использовать аппроксимацию «пьедестала», вызванного светорассеянием, линейной функцией как наиболее простой, и дающий относительную погрешность всего 5%.

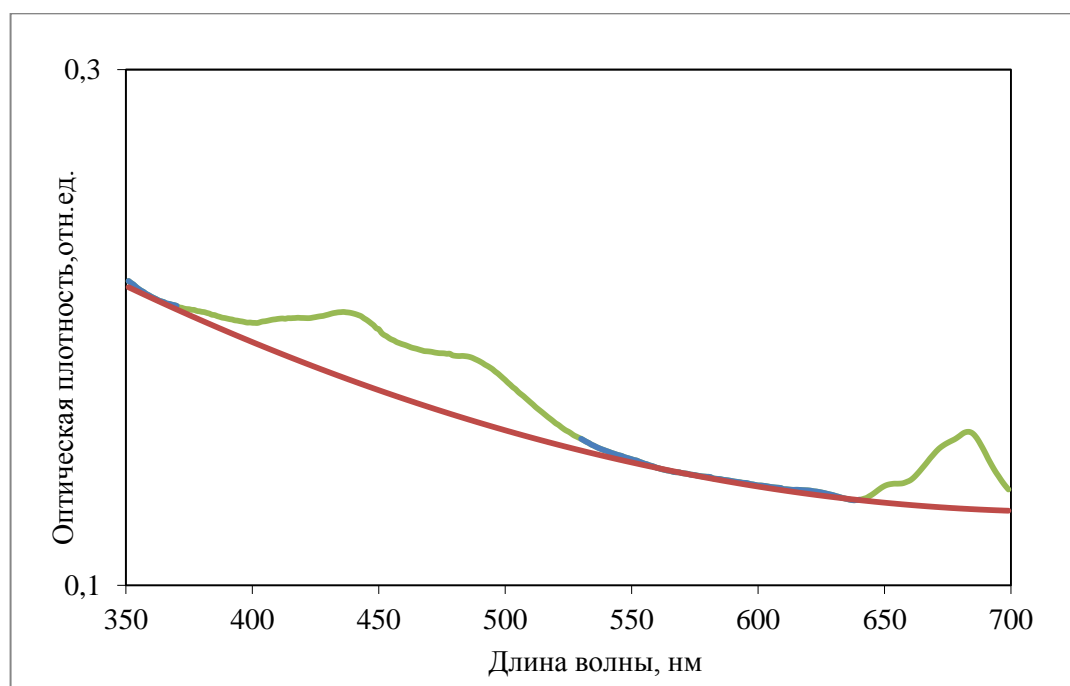


Рис.5. Спектр оптической плотности суспензии клеток культуры *Chlorella vulgaris* с аппроксимирующей линией для светорассеяния.

Как показывают рис. 6-7 зависимости поглощения хлорофилла от концентрации клеток после учёта светорассеяния получились линейными для обеих культур водорослей во всем исследованном диапазоне концентраций с коэффициентами корреляции $R^2=0,9937$ для *Chlorella vulgaris* и $R^2=0,9967$ для *Scenedesmus quadricauda*. Коэффициент линейной регрессии получился примерно в 7 раз больше для *Scenedesmus quadricauda*, поскольку клетки этой водоросли крупнее и содержат больше хлорофилла по сравнению с клетками *Chlorella vulgaris*.

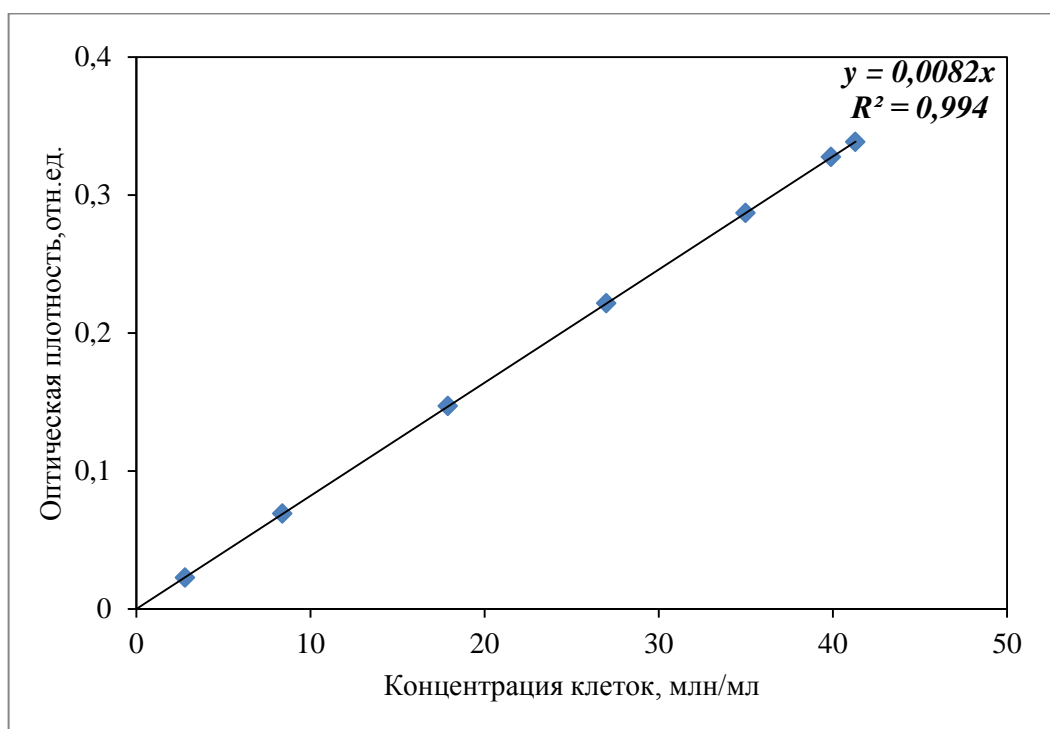


Рис.6. Зависимость оптической плотности в области поглощения хлорофилла с учётом светорассеяния от концентрации клеток культуры *Chlorella vulgaris* в суспензии.

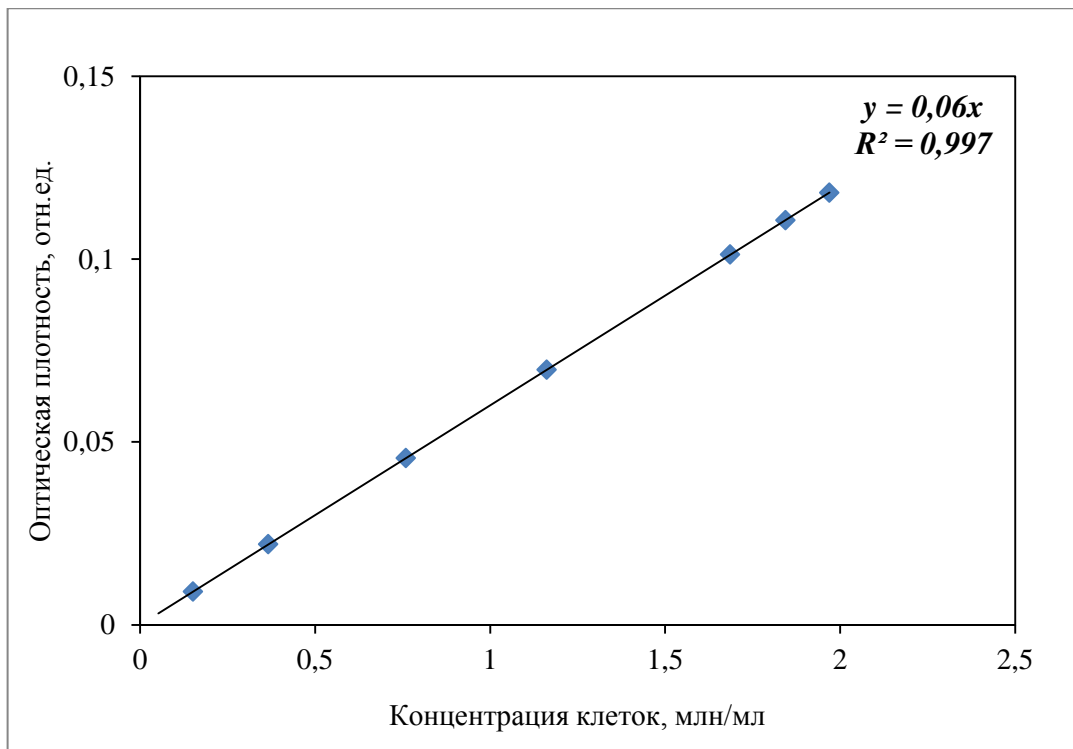


Рис.7. Зависимость оптической плотности в области поглощения хлорофилла с учётом светорассеяния от концентрации клеток культуры *Scenedesmus quadricauda* в суспензии.

2.3. Спектры флуоресценции суспензий водорослей

На рис. 8-9 показаны типичные спектры флуоресценции при возбуждении длиной волны 620 нм. На этих спектрах максимум на длине волны $\lambda = 685$ нм соответствует свечению хлорофилла *a*. Интенсивность флуоресценции как в максимуме полосы, так и интегральная по спектру возрастают с увеличением концентрации клеток в пробе.

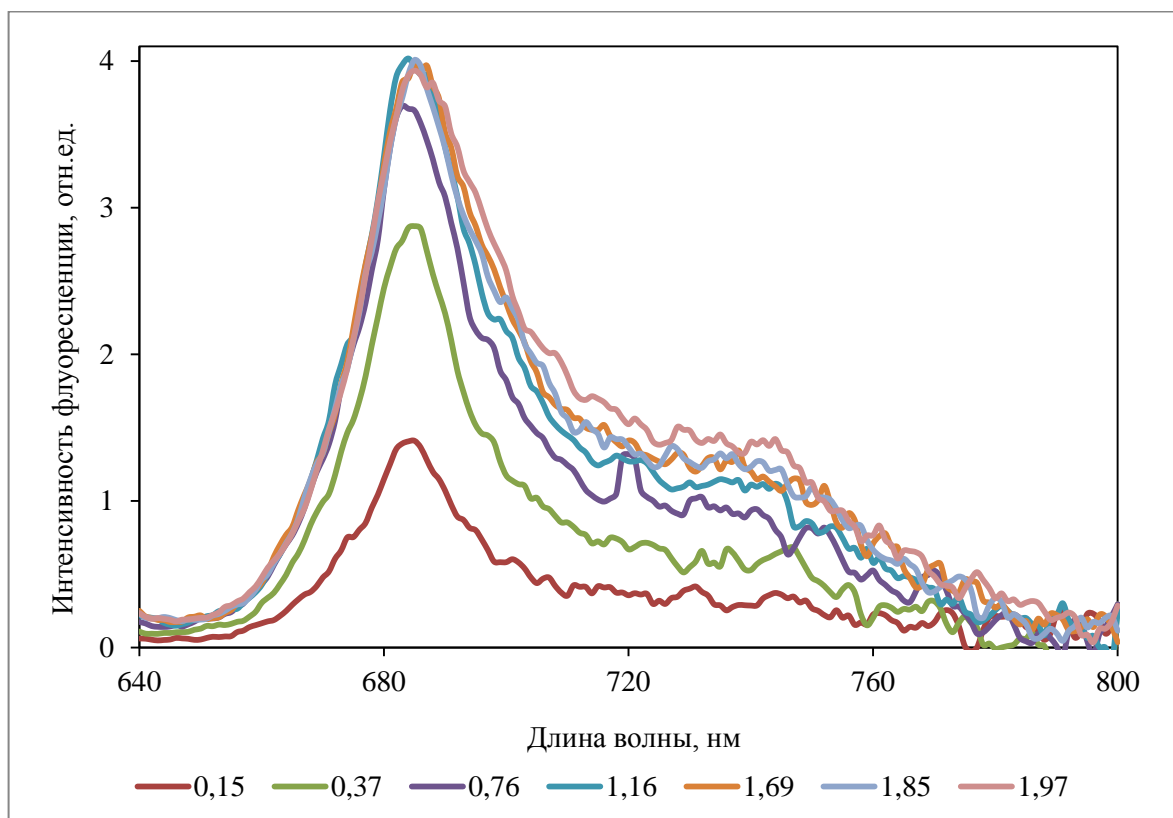


Рис.8. Спектры флуоресценции для суспензии культуры *Scenedesmus quadricauda*. Длина волны возбуждения 620 нм. Концентрации клеток приведены в млн/мл.

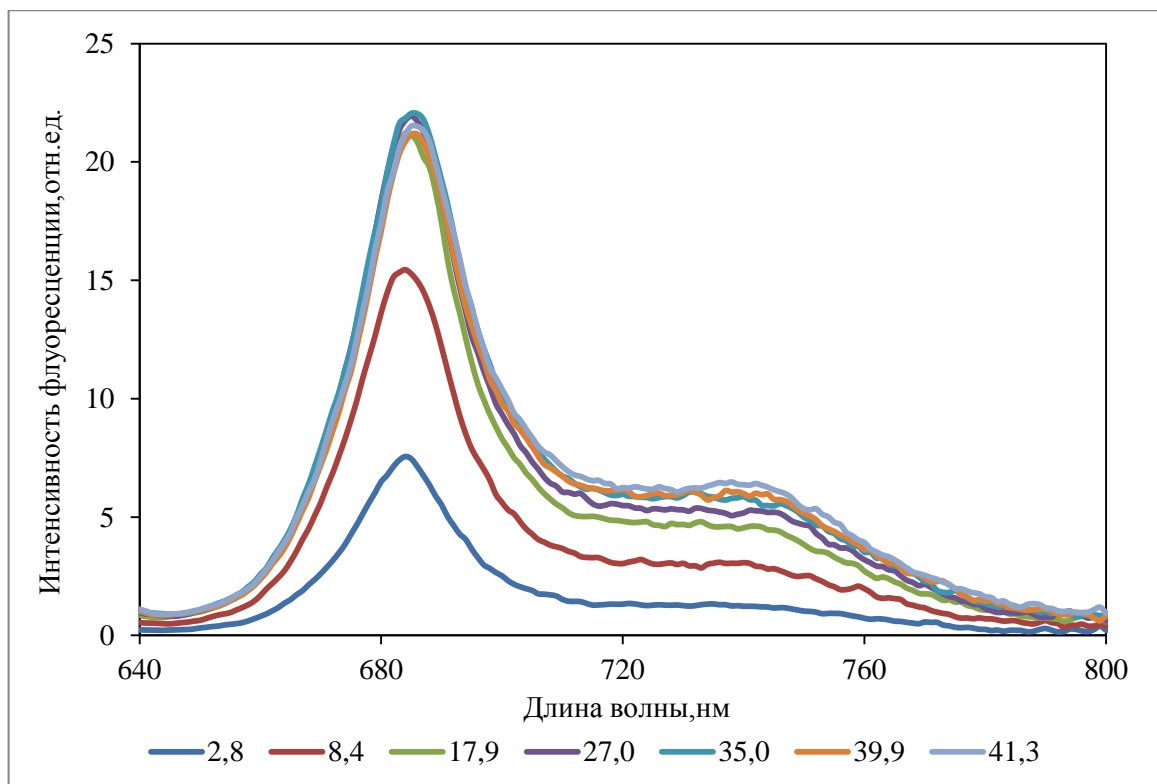


Рис.9. Спектры флуоресценции для суспензии культуры *Chlorella vulgaris*. Длина волны возбуждения 620 нм. Концентрации клеток приведены в млн/мл.

Однако зависимости интенсивности испускания от концентрации клеток перестают быть линейными для проб с оптической плотностью, превышающей 0,1 (рис.10-11), так как происходит значительное ослабление возбуждающего света из-за наличия светорассеяния. Такому значению оптической плотности соответствуют численности клеток: *Chlorella vulgaris* – 12 млн клеток/мл, *Scenedesmus quadricauda* – 1,7 млн клеток/мл. Разница в концентрации клеток, соответствующей оптической плотности 0,1, для двух культур водорослей объясняется различием в размерах их клеток. Типичный размер клеток *Chlorella vulgaris* 5-10 мкм. *Scenedesmus* образует ценобии (колонии) из 4-16 продолговатых клеток длиной 27 мкм и шириной 7 мкм, соединённых боковыми стенками [52].

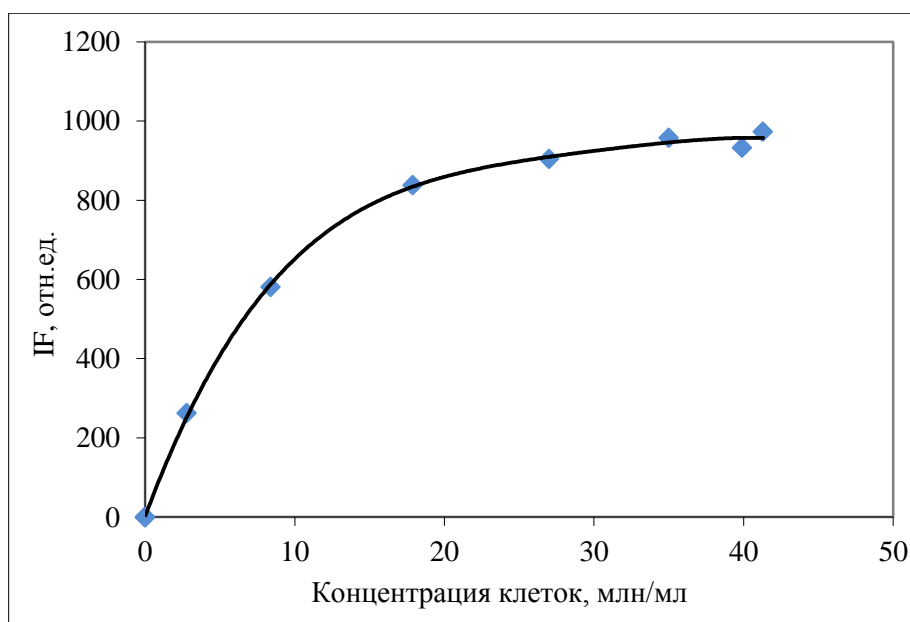


Рис. 10. Зависимость интегральной по спектру интенсивности флуоресценции IF хлорофилла в суспензии культуры *Chlorella vulgaris* от концентрации клеток.

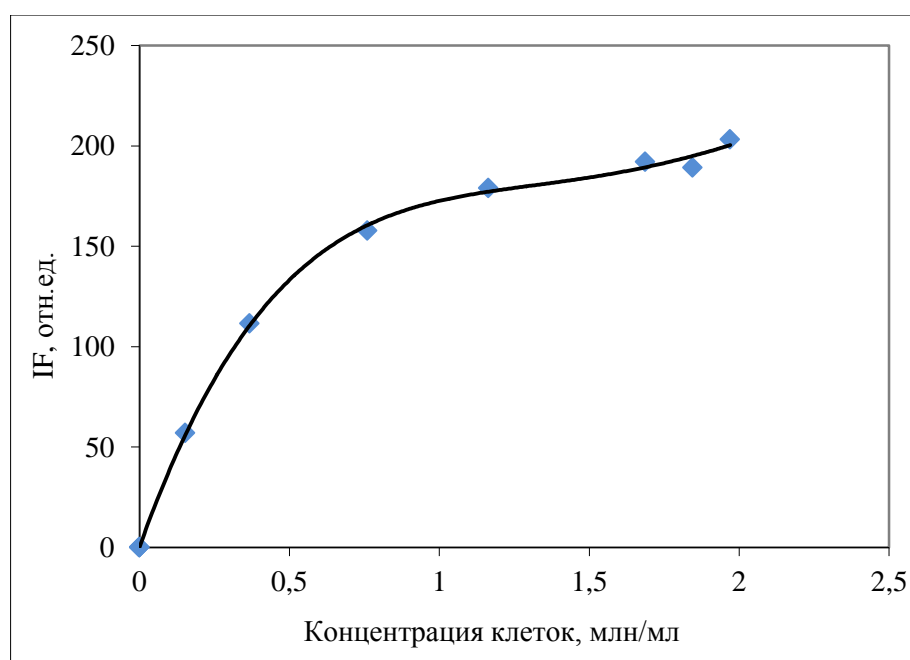


Рис. 11. Зависимость интегральной по спектру интенсивности флуоресценции IF хлорофилла в суспензии культуры *Scenedesmus quadricauda* от концентрации клеток.

При возрастании концентрации клеток отмечается не только рост интенсивности флуоресценции, но и изменение формы полосы испускания хлорофилла. При больших концентрациях клеток отношение интенсивностей длинноволновой полосы флуоресценции (740 нм) и коротковолновой (685 нм)

равно приблизительно 0,3, при малых концентрациях оно стремится к 0,17. Такое изменение формы спектра можно объяснить более значительным поглощением коротковолновой флуоресценции клетками суспензии водорослей по сравнению с длинноволновой из-за перекрывания спектра поглощения и испускания хлорофилла (ср. рис. 3-4 и 8-9).

Отметим, что исследование проводилось на двух лабораторных культурах водорослей, концентрацию которых изменяли разбавлением питательной средой, т.е. клетки водорослей в разных пробах были одной и той же фазы роста и в одном и том же физиологическом состоянии. Как было отмечено ранее, отношение интенсивностей длинноволновой и коротковолновой флуоресценции хлорофилла является интегральным показателем физиологического состояния и фотосинтетической активности растения, и поэтому может изменяться у клеток одной и той же культуры в зависимости от условия выращивания.

2.4. Коррекция флуоресценции на светорассеяние

Для того, чтобы концентрационные зависимости интенсивности флуоресценции можно было использовать для определения численности клеток, необходимо произвести коррекцию величины флуоресценции на светорассеяние на длине волны возбуждения. Для такой коррекции используем формулу:

$$NF = IF / 10^{0,5D},$$

где IF – интегральная по полосе испускания интенсивность флуоресценции хлорофилла, NF – флуоресценция после коррекции, D – значение оптической плотности на длине волны возбуждения для оптического пути 1 см. Величина $0,5 D$ соответствует ослаблению света при распространении от стенки до центра кюветы ($0,5$ см в нашем случае).

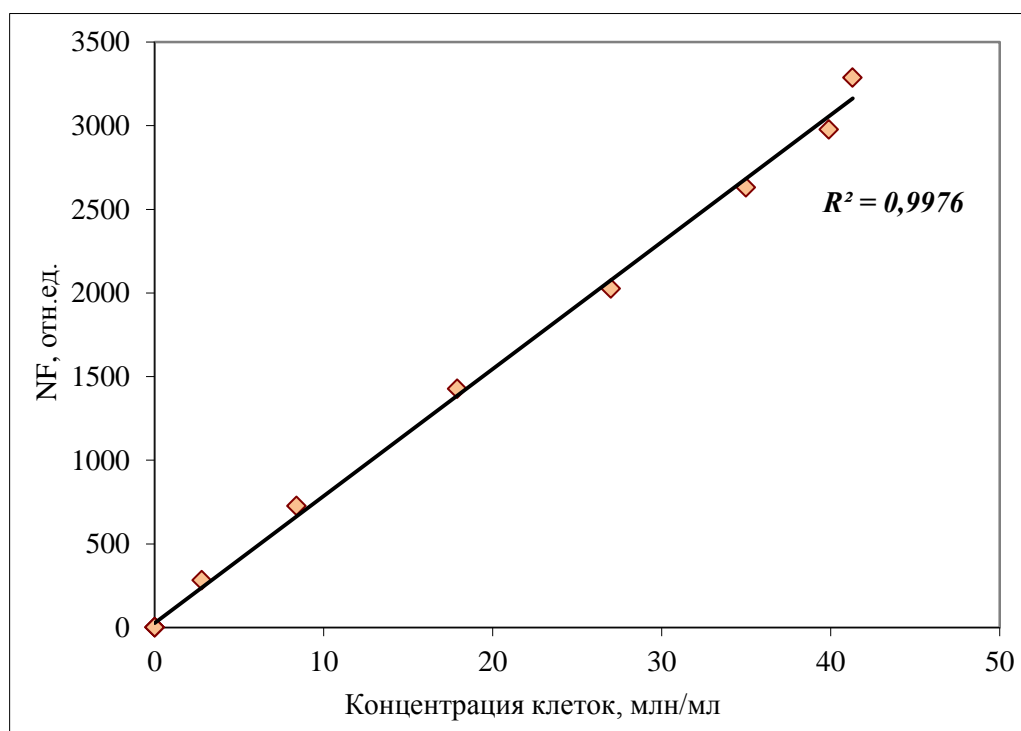


Рис. 12. Зависимость от концентрации клеток интенсивности флуоресценции NF хлорофилла после коррекции на светорассеяние для суспензии культуры *Chlorella vulgaris*.

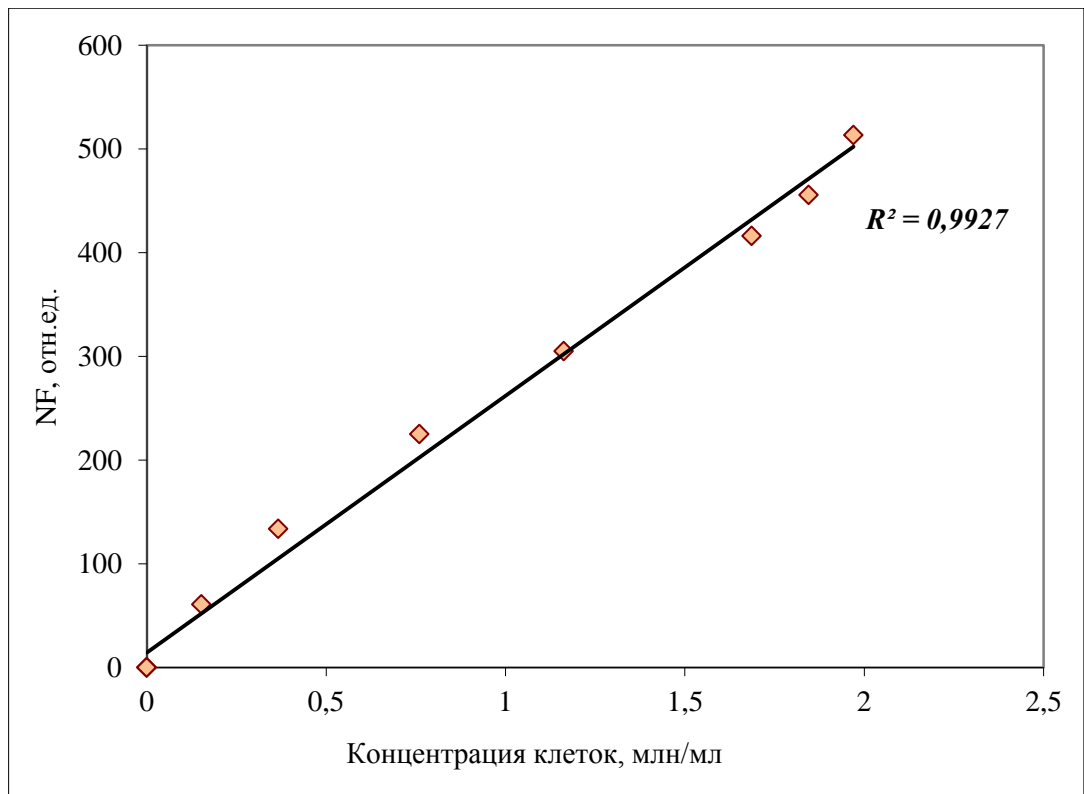


Рис. 13. Зависимость от концентрации клеток интенсивности флуоресценции NF хлорофилла после коррекции на светорассеяние для суспензии культуры *Scenedesmus quadricauda*.

Концентрационные зависимости флуоресценции после коррекции на светорассеяние возбуждающего излучения показаны на рис. 12-13. Как видно из рисунков, эти зависимости практически линейны (в сравнении с рис. 10-11) и могут использоваться для оценки концентрации клеток водорослей в большом диапазоне изменения концентрации: для культуры *Chlorella vulgaris* до 41 млн клеток/мл, для *Scenedesmus quadricauda* – 2 млн клеток/мл.

2.5. Основные результаты главы II

В работе были измерены спектры поглощения и флуоресценции культуры зелёных водорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda*, рассмотрены различные методы обработки спектров. На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- Спектры оптической плотности суспензии культуры зелёных водорослей содержат полосы поглощения основных пигментов каротиноидов (400-550 нм) и хлорофилла (650-700 нм), но при этом существенный вклад вносит светорассеяние, убывающее с ростом длины волны. Для обработки спектров поглощения можно использовать метод аппроксимации линейной или квадратичной функцией «пьедестала», вызванного светорассеянием. Зависимости величины поглощения хлорофилла от концентрации клеток водорослей оказались линейными с коэффициентами доверия $R^2=0,9937$ для *Chlorella vulgaris* и $R^2=0,9967$ для *Scenedesmus quadricauda* во всем диапазоне концентраций клеточных культур, использованных в лабораторном эксперименте.
- В спектрах флуоресценции максимум на длине волны $\lambda = 685$ нм соответствует испусканию хлорофилла *a*, как основного флуоресцирующего вещества у растений. Зависимости интенсивности испускания от концентрации клеток перестают быть линейными для проб с оптической плотностью, превышающей 0,1. Однако предложенная коррекция флуоресценции на рассеяние света клетками, проведенная с учётом измеренных значений оптической плотности, показала линейность рассчитанных флуоресцентных характеристик от концентрации клеток во всем диапазоне исследованных концентраций:

Chlorella vulgaris до 41 млн клеток/мл, *Scenedesmus quadricauda* – 2 млн клеток/мл.

- При возрастании концентрации клеток отмечается не только рост интенсивности флуоресценции хлорофилла, но и изменение формы его полосы испускания. При больших концентрациях клеток отношение интенсивностей длинноволновой полосы флуоресценции (740 нм) и коротковолновой (685 нм) равно приблизительно 0,3, при малых концентрациях оно стремится к 0,17 (при разбавлении двух лабораторных культур водорослей).

Основные результаты и выводы

В работе были изучены спектрально-люминесцентные свойства двух типов микроорганизмов – почвенных микроскопических грибов (микробицетов) и суспензий одноклеточных водорослей – и сделаны следующие основные выводы:

1. Если в среду роста микробицетов добавляли промышленные гуминовые препараты, то в процессе жизнедеятельности микробицеты трансформировали гуминовое вещество таким образом, что его спектральные свойства становились схожими со спектрами гуминовых веществ природной воды и почвы.
2. При добавлении наноалмазов в культуральную жидкость гриба *Cladosporium cladosporioides*, микробицеты выделяют продукты – метаболиты с характерной полосой свечения в районе 460 нм.
3. Для обработки спектров поглощения суспензии водорослей с высокой оптической плотностью можно использовать метод аппроксимации линейной или квадратичной функцией «пьедестала», вызванного светорассеянием.
4. Предложенная коррекция флуоресценции на рассеяние света клетками водорослей, проведенная с учётом измеренных значений оптической плотности, показала линейность рассчитанных флуоресцентных характеристик от концентрации клеток во всем диапазоне исследованных концентраций: *Chlorella vulgaris* до 41 млн клеток/мл, *Scenedesmus quadricauda* – 2 млн клеток/мл.
5. При больших концентрациях клеток отношение интенсивностей длинноволновой полосы флуоресценции хлорофилла (740 нм) и коротковолновой (685 нм) равно приблизительно 0,3, при малых концентрациях оно стремится к 0,17 (при разбавлении двух лабораторных культур водорослей).

Полученные результаты будут использованы в проектах экологического мониторинга совместно с биологами и химиками факультета почвоведения МГУ.

Автор благодарит заведующую Лабораторией экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) факультета почвоведения МГУ доктора биологических наук **Терехову Веру Александровну** и сотрудников этой лаборатории **Вавилову Валерию Михайловну** и **Федосееву Елену Валерьевну**, а также научного сотрудника кафедры рационального природопользования географического факультета МГУ **Горшкову Ольгу Михайловну** за предоставленные пробы и обсуждения результатов измерения.

Список литературы

1. Карнаухов В.Н. Спектральный анализ в клеточном мониторинге окружающей среды. Москва “Наука”, 2001.
2. Пацаева С.В., Полякова И.Б., Хунджуга Д.А., Южаков В.И. Спектральные методы оценки концентрации клеток водорослей в суспензиях с коррекцией на светорассеяние. // Физические проблемы экологии (экологическая физика): Сборник научных трудов / Под ред. В.И.Трухина, Ю.А. Пирогова, К.В.Показеева.-№17.С.260-273 (2010).
3. Горшкова О.М., Краснушкин А.В., Пацаева С.В., Федосеева Е.В., Хунджуга Д.А., Южаков В.И.. Флуоресценция и наночастицы растворенного органического вещества вод оз. Байкал и других водоемов Байкальского региона // В сб. «Экологические исследования, опасности, решения, включая труды конференции “Водные экосистемы организмы инновации-10”», М. Изд-во МАКС-Пресс. Т.13. С.52-53. 2008.
4. Хунджуга Д.А., Пацаева С.В., Южаков В.И., Гладкова М.М., Попутникова Т.О., Терехова В.А., Федосеева Е.В.. Использование спектров поглощения и флуоресценции клеток водорослей для измерения их концентрации в водной среде. В сб. «Экологические исследования, опасности, решения, включая труды конференции “Водные экосистемы организмы инновации-11”», М. Изд-во МАКС-Пресс. 2010. (в печати)
5. Хунджуга Д.А., Федосеева Е.В. Изучение трансформации гуминовых веществ микромицетами с помощью спектральных методов. Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов – 2010» - М.: МАКС Пресс. СЕКЦИЯ “Физика”. Подсекция Оптика. 2010.
6. Patsaeva S., Shubina D., Khundzhua D., Yuzhakov V., Yakimenko O., Izosimov A., Fedoseeva E., Terekhova V. Differentiation of Natural and Commercial Humic Substances Using Fluorescence Spectroscopy. The XII International Conference on Laser Applications in Life Sciences June 9-11, 2010, Oulu, Finland, Book of abstracts, P.275 (2010).
7. Terekhova V., Yakimenko O., Fedoseeva E., Khundzhua D., Shubina D., Yuzhakov V., Patsaeva S. Transformations of humic substances by micromycetes revealed

- by fluorescence spectroscopy. Meeting Abstract. Presented at the 15th International Humic Substances Society Meeting. June 27 to July 2, 2010. Pto. De la Cruz, Tenerife, Spain (2010).
8. *Терехова В.А.* Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем.- М.: Наука, 2007.
 9. *Волков А.* По грибы в научном всеоружии. Журнал “Знание-сила” 8/2009.
 10. *Грибанова Л.В.* Основы микологии. Москва 2005.
 11. *Завразин Г.А.* Лекции по природоведческой микробиологии. Наука 2004.
 12. *Кузнецов А.Б.* Гумус почвы и его “создатели”.2008.
 13. *Орлов Д. С.,* 1996. Химия и охрана почв. Соросовский образовательный журнал, №3, с. 65-74.
 14. *Селевцев В.Ф.* Гумус почв и его свойства. 2008.
 15. *Puzyr A.P., Baron A.V., Purtov K.V., Bortnikov E.V., Skobelev N.N., Mogilnaya O.A., Bondar V.S.* // Diamond and Related Materials. 2007. V.16. P.2124-2128.
 16. *Бондарь В.С., Пузырь А.П.* // Конструкции из композиционных материалов. 2005. Вып.4. С.80-94.
 17. *Purtov K.V., Burakova L.P., Puzyr A.P., Bondar V.S.* // Nanotechnology. 2008. V.19. P.1-3.
 18. *Бондарь В.С., Пуртов К.В., Пузырь А.П.* Очерки экологической биофизики. Новосибирск: Изд-во СО РАН. 2003. С.212-230.
 19. *Левшин Л. В., Салецкий А. М.* Оптические методы исследования молекулярных систем. Издательство Московского университета, 1994г.
 20. *Шубина Д.М., Якименко О.Я., Пацаева С.В., Изосимов А.А., Терехова В.А., Федосеева Е.В., Южаков В.И.* Спектральные свойства водных растворов промышленных гуминовых препаратов // Вода: Химия и экология. 2010.
 21. *Горшкова О.М., Пацаева С.В., Федосеева Е.В., Шубина Д.М., Южаков В.И.* Флуоресценция растворенного органического вещества природной воды // Вода: Химия и экология. 2009. №11.
 22. *Федосеева Е.В., Пацаева С.В., Терехова В.А.* Влияние гумата калия на некоторые физиологические характеристики микроскопических грибов разной пигментации. Микология и фитопатология. 2009. Т.43. Вып.3.

23. *А.С.Милюков, С.В.Пацаева, В.И.Южаков, О. М. Горшкова, Е. М. Пращикина*, 2007. Флуоресценция наночастиц растворенного органического вещества в природной воде. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3. Физика. Астрономия. № 6, с. 34-38.
24. *Мальцев А.А.* Молекулярная спектроскопия. Издательство Московского университета, 1980.
25. *Реунова Ю.А.* Влияние селена на морфофункциональные характеристики морской одноклеточной водоросли *Dunaliella Salina (Chlorophyta)*. Автореф. дисс. канд. биол. наук Владивосток, 2007. 22 с.
26. *Асланиди К.Б., Шалапенко А.А., Карнаухов В.Н., Берестовская Н.Г., Шавкин В.И.* Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла (техника биомониторинга). Пушкино, 1988. 43 с.
27. *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.
28. *Рубин А.Б.* Биофизические методы в экологическом мониторинге / Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. №4. С. 7-13.
29. *Карнаухов В.Н.* Спектральный анализ в клеточном мониторинге окружающей среды. Москва: Наука, 2001.
30. *Merzlyak M.N., Naqvi K.R.* On Recording the True Absorption and Scattering Spectrum of a Turbid Sample: Application to Cell Suspensions of the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Photochem. Photobiol. (B)/ 2000/ V. 58. P. 123-129.
31. *Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л.* Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей / Физиология растений, 2008. Т. 55, №3. С. 464-470.
32. *Сидоренко В.М.* Молекулярная спектроскопия биологических сред. Москва: Высшая школа, 2004.
33. *Жмур Н. С, Орлова Т. Л.* Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по измерению уровня

- флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ФР. 1.39.2001.00284).-М.: «Акварос», 2001.-43 с.
34. *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.
35. *Клейтон Р.* Фотосинтез. Физические механизмы и химические модели. М., Мир, 1984. 352 с.
36. *Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия. М., Дрофа, 2004. 640 с.
37. *Гавриленко В.Ф., Гусев М.В., Никитина К.А., Хоффман П.* Избранные главы физиологии растений. М., Изд-во Моск. Университета. 1986. 440 с.
38. *Рубин Б.А., Гавриленко В.Ф.* Биохимия и физиология фотосинтеза. М., Изд-во Моск. Университета. 1977. 328 с.
39. *Верзилин Н.Н., Ананьева Т.И.* Действие длительного углеродного голодания на ультраструктуру клеток хлореллы. – В кн.: Электронная микроскопия в ботанических исследованиях. Рига. 1978.
40. *Kühlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y.* Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography // *Nature*. 1994. V. 367. P.614-621.
41. *Vermaas W.* Molecular-biological approaches to analyze photosystem 2 structure and function // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1993. V. 44. P. 457-481.
42. *Твердислов В.А., Тихонов Н.А., Яковенко Л.В.* Физические механизмы функционирования биологических мембран. М.: Изд-во Моск. Университета, 1987. 200 с.
43. *Полякова И.Б.* Медленная индукция флуоресценции листьев растений при разной фотосинтетической активности. Дисс. ... канд. физ.-мат. Наук. М.: МГУ, 2002. 148 с.
44. *Horton P., Ruban A.V.* Regulation of photosystem II // *Photosynth. Res.* 1992.V. 34. P. 375-385.
45. *Kleima F.J., Hobe S., Calkoen F., Urbanus M.L., Peterman E.J.G., van Grondelle R., Harald P., van Amerongen H.* Spectroscopic characterization of

- reconstituted LHCP which contains mainly Chl b and xanthophylls // Photosynthesis: Mechanisms and Effects / Ed. by Garab G. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 1998. V.I. P. 259-264.
46. *Караваев В.А.* Нелинейные регуляторные процессы в фотосинтезе высших растений. Дисс. ... докт. физ.-мат. Наук. М.: МГУ, 1990. 416 с.
47. *Кукушкин А.К., Бадретдинов Д.З., Кузнецова С.А.* Особенности применения флуоресцентных методов при низкой температуре в экологических исследованиях. Тезисы докладов Третьей всероссийской научной конференции “Физические проблемы экологии (Экологическая физика)”. М., 2001. С. 163-164.
48. *Патин С.А.* Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность мирового океана. М.: Пищевая промышленность, 1979. 303 с.
49. *Полынов В.А., Маторин Д.Н., Вавилин Д.В., Венедиктов П.С.* Действие низких концентраций меди на фотоингибирование фотосистемы II у *Chlorella Vulgaris* (Beijer) / Физиология растений, 1993. Т. 40. №5. С. 754-759.
50. *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. Vol. 9, No 2. P. 37-39.