

## Экстракционно-флуориметрическое определение хлорофилла «а» в природных водах

**\*З.А. Темердашев<sup>1</sup>, Л.Ф. Павленко<sup>2</sup>, Я.С. Ермакова<sup>1,2</sup>,  
И.Г. Корпакова<sup>1</sup>, Б.Д. Елецкий<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Кубанский государственный университет,  
Российская Федерация, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149  
<sup>2</sup>Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» («АзНИИРХ»),  
Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. Береговая 21в

\*Адрес для переписки: Темердашев Зауаль Ахлоович, E-mail: temza@kubsu.ru

Поступила в редакцию 24 мая 2019 г., после исправления – 13 июня 2019 г.

В статье проводится анализ методов определения хлорофилла «а» в природных водах – основного пигмента фитопланктона, являющегося индикатором первичной биопродуктивности и трофности водоема. Приводится сравнительная характеристика спектрометрических методов определения, их достоинства и недостатки. Обсуждаются особенности применения различных видов спектрометрического определения аналита: от классических спектрофотометрических до методов дистанционного зондирования водоемов. Показана предпочтительность определения хлорофилла флуоресцентными методами, которые используются в различных вариантах реализации. Обоснована и реализована методика экстракционно-флуоресцентного определения хлорофилла «а» после экстракции его из воды хлороформом и измерении интенсивности флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}} = 418$  нм и  $\lambda_{\text{люм}} = 675$  нм. Проведено сравнение результатов определения хлорофилла «а» стандартизированной спектрофотометрической и разработанной методиками на модельных и реальных пробах воды. Показано, что в области низких концентраций хлорофилла «а» (0,05 мкг аналита в 1000 см<sup>3</sup> воды) аналитический сигнал регистрируется только флуориметрическим методом, а в области более высоких концентраций (0,2 мкг аналита в 1000 см<sup>3</sup> воды) спектрофотометрическая стандартизированная методика дает завышенные результаты. Разработанная методика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла «а» в природных водах (пресных и морских) метрологически аттестована и внесена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений.

**Ключевые слова.** Хлорофилл «а», экстракционно-флуориметрическое определение, трофность водоемов.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 3, pp. 323-333

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.3.001

## Extraction-fluorimetric determination of chlorophyll “a” in the natural waters

**\*Z.A. Temerdashev<sup>1</sup>, L.F. Pavlenko<sup>2</sup>, Ya.S. Ermakova<sup>1,2</sup>, I.G. Korpakova<sup>1</sup>,  
B.D. Eletsii<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry and High Technology,  
Kuban State University, Krasnodar, 350040, Russian Federation  
<sup>2</sup>Azov-Black Sea branch of VNIRO (“AzNIIRKH”),  
Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

\*Corresponding author: Temerdashev Zauval' Ahloovich E-mail: temza@kubsu.ru

Submitted 24 May 2019, received in revised form 13 June 2019

The assessment methods of chlorophyll «a» in the natural waters have been analyzed. This pigment of phytoplankton is the main indicator of the primary bioproductivity and trophicity of the reservoir. The key spectrometric methods of determination were compared, and their advantages and disadvantages were

discussed. The application features of different types of spectrometric determination of the analyte from classical spectrophotometric methods to remote sensing of water bodies were considered. The preference was shown for the determination of chlorophyll by the fluorescent methods, which were used in different implementation variations. The method of extraction-fluorescent determination of chlorophyll «a» was substantiated and implemented after the chlorophyll extraction from the water with chloroform and measuring the fluorescence intensity at  $\lambda_{exc} = 418 \text{ nm}$  and  $\lambda_{lum} = 675 \text{ nm}$ . The results of the chlorophyll «a» determination were compared using the standardized spectrophotometric and the developed techniques for the model and real water samples. It was educed that in the area of low concentrations of chlorophyll «a» (0.05  $\mu\text{g}$  of analyte in 1000  $\text{cm}^3$  of water) the analytical signal was recorded only by the fluorimetric method, while in the area of higher concentrations (0.2  $\mu\text{g}$  of analyte in 1000  $\text{cm}^3$  of water) the standardized spectrophotometric method produced the overestimated results. The developed method for the extraction-fluorimetric determination of chlorophyll «a» in the natural waters (both fresh and marine) was metrologically certified and put into the register of the Federal Information Fund for ensuring the uniformity of measurements.

**Key words:** chlorophyll «a», extraction - fluorimetric determination, trophicity of the reservoir.

## ВВЕДЕНИЕ

При оценке экологического состояния водных объектов большое внимание уделяется фитопланктону – главному продуценту первичного органического вещества. Наличие и количество пигментов служит показателем состояния фитопланктона и позволяет судить как о трофности водного объекта, так и о его токсичности. Основным показателем фотосинтетической активности фитопланктона является концентрация хлорофилла «а». Для основных трофических типов водоемов установлены характерные концентрации хлорофилла «а»: от 0.1 до 1.0  $\text{мкг/дм}^3$  для олиготрофных; от 1.0 до 10  $\text{мкг/дм}^3$  для мезотрофных; свыше 10  $\text{мкг/дм}^3$  для эвтрофных [1]. По содержанию хлорофилла «а» в фитопланктоне определяют биомассу микроводорослей и оценивают первичную биопродуктивность водоема. Существует прямая зависимость между количеством хлорофилла «а» и величиной продукции фитопланктона. Первичная продукция, образуемая фитопланктоном в процессе фотосинтеза, обуславливает развитие остального живого мира морей [2].

Существующие на сегодняшний день методы определения хлорофилла «а», в основном, относятся к спектрометрическим. Для измерения концентрации хлорофилла «а» наиболее часто используется спектрофотометрический метод, разработанный еще в 1930-1940 гг., включающий фильтрацию исследуемых проб, экстракцию анализа органическим растворителем с последующим спектрофотометрическим его определением [3]. К наиболее известным относятся спектрофотометрические методики определения хлорофилла «а» с экстракцией этанолом [4, 5] и ацетоном [6]. Авторы [7-9] описывают результаты исследований с использованием в качестве экстрагента метанола, который уменьшает время экстракции и устраняет необходимость кипячения или гомогенизации образцов. Для выделения основного пигмента (хлорофилла «а») из пресноводных водорослей авторами [10] предложено использовать волокнистые фильтры с использованием в качестве экстрагента смеси уксусной кислоты с 90 % этанолом. Qiu N. с соавторами [11] предложен метод быстрого извлечения хлоро-

филла «а» путем центрифугирования водорослей при 5000 оборотах/мин при 4 °С в течение 15 мин., дальнейшее инкубирование при 65 °С в течение 1-2 ч в темноте с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО) и 90 % ацетона, а затем детектирование анализа. Такая последовательность операций, по мнению авторов, позволяет значительно упростить процесс экстракции. В работе [12] описано, что при использовании 90 % ацетона наблюдается более высокая степень извлечения общего хлорофилла и экстракт является более стабильным во времени, чем в случаях с другими растворителями.

Хлорофиллы имеют две основные полосы поглощения спектра: одна в синей области (менее 460 нм) и одна в красной (630–670 нм). Поскольку каротиноиды, совместно экстрагируемые с хлорофиллами, также имеют интенсивные максимумы поглощения в синей области, спектрофотометрические измерения ограничены полосами поглощения в красной области. Из-за перекрытия основных полос поглощения и вторичных максимумов в диапазоне 630–670 нм используются формулы расчетов концентрации хлорофиллов в одном экстракте, основанные на измерении оптической плотности на трех длинах волн с использованием трехволновых уравнений (называемых «трихроматическими уравнениями»). Существует три типа спектрофотометрических методов: монохроматический, дихроматический и трихроматический. Трихроматические методы были разработаны для определения трех типов хлорофилла («а», «b» и «с») в отсутствие продуктов разложения [13].

Расчет концентрации хлорофилла «а» основан на известных удельных спектральных показателях поглощения света хлорофиллом «а» и основными компонентами, мешающими анализу. Первые трихроматические уравнения для расчёта концентрации хлорофилла «а» с поправкой на хлорофиллы «b» и «с» опубликованы в 1952 г. [14]. С 1975 г. хлорофиллы «а», «b», «с» определяют по уравнению Джеффри и Хамри [15]. Для учёта влияния феофетина на определение анализа в 1967 г. предложена модификация монохроматического метода с подкислением экстракта [16]. С целью увеличения точности определения анализа, в дальнейшем, эти

Таблица 1

Уравнения для спектрофотометрического определения хлорофилла «а»

Table 1

Equations for the spectrophotometric determination of chlorophyll «a»

Метод расчета	Уравнение для расчета концентрации хлорофилла «а», $C_{\text{хл «а»}}$ , мкг/л	Ссылка
Монохроматический	$(13.14 \cdot D_{665}) \cdot (v/V \cdot L)$	[19]
Дихроматический	$26.33 \cdot ((D_{665} - D_{750}) - (D_{665} - D_{750})') \cdot (v/V \cdot L)$	[16]
Дихроматический	$29.6 \cdot (D_{664} - D_{750}) \cdot (v/V \cdot L)$	[4, 5]
Дихроматический	$11.9 \cdot D_{663} \cdot ((D_{663} / D_{654} \cdot 0.93) - 0.33) \cdot (v/V \cdot L)$	[20]
Трихроматический	$(11.6 \cdot D_{665} - 1.3 \cdot D_{645} - 0.14 \cdot D_{630}) \cdot (v/V \cdot L)$	[21]
Трихроматический	$(11.85 \cdot D_{665} - 1.54 \cdot D_{645} - 0.08 \cdot D_{630}) \cdot (v/V \cdot L)$	[15]
Трихроматический	$(11.85 \cdot (D_{665} - D_{750}) - 1.54 \cdot (D_{645} - D_{750}) - 0.08 \cdot (D_{630} - D_{750})) \cdot (v/V \cdot L)$	[6]

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

уравнения неоднократно совершенствовались. Риччи [17, 18] предложен универсальный набор уравнений для определения хлорофиллов «а», «b», «с» и «d» при использовании в качестве экстрагента 90 % ацетона, 100 % метанола и этанольных растворителей. Следует отметить, что для вычисления массовой концентрации хлорофилла «а» используются разные уравнения (табл. 1).

Спектрофотометрический анализ может давать различные результаты в зависимости от того, какое уравнение для расчетов используется. Грубые ошибки могут быть допущены при расчете концентраций хлорофилла «а» по трехволновым уравнениям при содержании в экстрактах большого количества феопигмента «а» и хлорофилла «d». В связи с этим трихроматические уравнения следует использовать только в том случае, если экстракт не имеет значительного содержания феопигмента «а» и хлорофилла «d» [18].

При определении низких концентраций хлорофилла «а», в силу невысокой чувствительности вышеописанных спектрофотометрических методик, требуется его концентрирование из больших объемов проб воды. В табл. 2 приведены рекомендуемые стандартизированными методиками [5, 6] объемы

Таблица 2

Рекомендуемые объемы воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла «а» в пробе методиками [5, 6]

Table 2

Recommended volumes of water at the given value of the expected chlorophyll «a» concentration in the samples using methods [5, 6]

Концентрация хлорофилла «а», мкг/дм <sup>3</sup>	Объем пробы, дм <sup>3</sup>
0.05	более 40
0.1	от 20 до 40
0.5	от 4 до 20
5.0	от 0.4 до 4
50.0	от 0.2 до 0.4
100.0	от 0.02 до 0.2

воды при заданной величине ожидаемой концентрации хлорофилла «а» в пробе.

Для получения экстракта пробу воды фильтруют через мембранный фильтр GF/F с нанесенным слоем углекислого бария или магния, осадок размельчают (гомогенизируют). Считается, что добавление  $MgCO_3$  не оказывает значимого эффекта и может способствовать концентрированию пигментов [3], которые затем экстрагируют 90 % ацетоном, а светорассеивающую взвесь удаляют центрифугированием из экстракта.

ГОСТ 17.1.04.02-90 при проведении анализа допускает использование трёхволновых уравнений как в случае с подкислением экстракта, так и без него. В качестве растворителя используют 90 % ацетон, поскольку измеряемая абсорбция аналита в его растворах четко выражена. Однако, в отличие от этанола и метанола, из зелёных водорослей ацетон экстрагирует хлорофилл «а» не в полной мере. Также следует заметить, что пики поглощения хлорофиллов «а», «b», «с» и «d» в этаноле и метаноле в спектрах шире, меньше по величине и перекрываются [18].

В настоящее время для определения хлорофилла находят широкое применение метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и флуоресцентный анализ. Последний более эффективен для анализа популяции фитопланктона и анализа пигментов в пробах морской воды, когда требуется разделение сложных пигментных смесей. ВЭЖХ может обеспечить более точный учет фитопланктона, всех хлорофиллов, а также продуктов их деградации в водной среде, которые могут быть пропущены при микроскопическом подсчете [22-24].

Молекулы хлорофилла «а», входящие в состав живой клетки микроводорослей, флуоресцируют на характерной длине волны в диапазоне 680–690 нм. Эти преимущества флуориметрического метода становятся решающим доводом в пользу его использования в различных исследованиях, поскольку он позволяет определять органические вещества непосредственно в морской воде, без предварительной пробоподготовки. Флуориметрический метод позволяет также детектировать низкие концентрации

хлорофилла, недоступные другим спектральным и химико-биологическим методам. Для определения пигментов применяют спектрофлуориметры или флуориметры, которые, в свою очередь, бывают погружными или проточными. Экспрессность измерений флуоресценции аналита с помощью погружных флуориметров, работающих в режимах зонда или буксировки дает возможность повысить производительность определений органических веществ в воде. Флуориметры с несколькими источниками возбуждения флуоресценции обычно используют для определения таксономических групп фитопланктона [25-27]. Для калибровки флуориметров пользуются данными спектрофотометрического определения хлорофилла «а», тем самым обеспечивая калибровку и сравнение данных двух методов [28].

Достаточно широкое применение находят методы дистанционного зондирования спутниковыми системами и датчиками, которые применяют для качественной характеристики пространственно-временного распределения хлорофилла акватории водного объекта [13, 29]. Определение хлорофилла «а» с помощью датчиков дистанционного зондирования на основе мощных светодиодов обеспечивает возможность в короткие сроки получать данные о концентрации основного пигмента, применение волоконных датчиков позволяет эффективно реализовать метод лазерноиндуцированной флуоресценции для определения хлорофилла «а», фитопланктона в естественной среде его обитания [30-32]. Для расширения возможностей мониторинга внутренних и прибрежных вод изобретают новые, доступные по цене, чувствительные, мобильные приборы, которые работают полуавтоматически в полевых условиях. Авторы [33] представили устройство-прототип для измерения флуоресценции хлорофилла смартфоном SmartFluo. Лабораторные эксперименты SmartFluo показывают линейную корреляцию с концентрациями хлорофилла, измеренными на настольном лабораторном флуориметре.

Для оценки содержания хлорофилла «а» на больших площадях океанов и морей выбирают подход, основанный на применении спектральных характеристик излучения в синем и красном диапазонах спектра. В настоящее время на околоземной орбите работают различные дистанционные приборы, которые передают данные о спектральном составе восходящего излучения. Из полученных данных вычисляются биооптические характеристики верхнего слоя воды, например, концентрации хлорофилла «а». Данные, полученные с помощью дистанционного зондирования Земли, например, по спутниковым данным SeaWiFS, коррелируют с наземными измерениями концентрации хлорофилла «а» [34-36]. Однако, не все спутники могут действовать при измерениях в прибрежных акваториях, наиболее важных с точки зрения их применения в хозяйственной деятельности, в реках и озерах, не говоря о водоемах – более мелких или скрытых элементами ландшафта, также

спутниковые системы не позволяют проводить измерения в толще воды [37]. Немаловажным является необходимость процедуры атмосферной коррекции при получении и обработке результатов дистанционного зондирования Земли. В большинстве случаев процесс коррекции больших объемов данных автоматизирован, алгоритмы для этих целей рассчитываются, исходя из усредненных показателей, и они не учитывают особенности получения каждого конкретного снимка. Часто встречающаяся проблема при получении космических снимков – облачность. В связи с этим космические изображения суши, на которых значительную часть занимает облачность, порой не подлежат дальнейшему использованию [38].

Трудность изучения микроводорослей лазерными методами заключается также и в том, что их концентрация в воде может быть очень мала, что требует высокой чувствительности измерительного оборудования, а при лазерных измерениях в прибрежных водах необходимо учитывать влияние примесей и растворенных в воде других органических веществ. Для повышения чувствительности при измерении флуоресценции аналита стараются расположить оптическое оборудование (лазеры и спектрометры) как можно ближе к исследуемой среде, а работа в агрессивной морской среде приводит к значительному увеличению массы и габаритов оборудования и ухудшению их эксплуатационных характеристик [39].

Определение хлорофилла «а» в воде спектрофотометрическим, флуориметрическим и ВЭЖХ методами не выявили больших различий в абсолютных значениях, за исключением проб, когда феопигменты составляли более 50 % от общего количества фитопигментов [40].

Методы, описанные выше, являются альтернативными, в определенной степени дополняющими друг друга, но, в некоторых случаях, они дают различные значения содержания хлорофилла «а». Разработка гибридных подходов, таких как комбинированное поглощение-рассеивание и флуоресцентно-рассеивающие подходы, может оптимизировать рабочие характеристики в более широких диапазонах концентрации основного пигмента. Но, как следует из данных [41-45], оптимальная модель для определения хлорофилла «а» в водоемах различной трофности еще не разработана.

В настоящей работе представлены результаты исследования по разработке экстракционно-флуориметрической методики определения хлорофилла «а» в воде водных объектов с различной трофностью, включая ультраолиготрофные.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Объекты исследования.** Объектами исследования были пробы воды, отобранные при проведении работ по экологическому мониторингу водных объектов Азовского бассейна.

### Материалы и методики исследований.

Для проведения экспериментов использовали стандартный раствор хлорофилла «а» в хлороформе, приготовленный из реактива фирмы SIGMA-ALDRICH «С5753-1 мг». Все остальные реактивы и растворители имели квалификацию не ниже «х.ч.».

Экстракцию образцов воды проводили различными растворителями (гексан, четыреххлористый углерод, хлороформ) на механическом встряхивателе АБУ-6с (Россия). Интенсивность люминесценции экстрактов измеряли при  $\lambda_{\text{возб}} = 418$  нм и  $\lambda_{\text{люм}} = 675$  нм на спектрофлуориметре RF-5301 (Шимадзу, Япония). Концентрацию хлорофилла «а» определяли по градуировочному графику, построенному с использованием стандартного образца хлорофилла «а» (SIGMA-ALDRICH «С5753-1 мг»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для уменьшения объема проб воды и трудозатрат при определении хлорофилла «а» в природных водах была разработана методика, в основе которой лежит экстракционно-флуоресцентный метод.

### Выбор условий определения хлорофилла «а» в воде экстракционно-флуоресцентным методом

Важным этапом разрабатываемой методики является выбор растворителя, так как интенсивность флуоресценции, помимо природы анализата и его концентрации, зависит от свойств растворителя, в котором находится флуоресцирующее вещество. Для изучения экстракции пигментов из воды без стадии фильтрования пробы через мембранный фильтр использовались три наиболее широко распространенные для этих целей растворителя – гексан, четыреххлористый углерод, хлороформ, обладающие низкой растворимостью в воде. Из этих растворителей более высоким дипольным моментом обладает хлороформ, дипольный момент которого составляет 1.06, гексана и тетрахлорметана – 0.

Важным аспектом выбора условий детектирования является обоснование условий детектирования анализата. Хлорофиллы «b», «c», «d» естественно, в условиях экстракции хлорофилла «а» также извлекаются в органическую фазу. Однако мешающее влияние этих пигментов будет мало, поскольку хлорофиллы «c» и «d» в незначительных количествах встречаются в немногочисленных видах водорослей. По данным [46-47] содержание хлорофилла «d» в водорослях водных экосистем не превышает 3-4% от концентрации хлорофилла «а». Содержание хлорофилла «c» в изученных объектах еще ниже. В некоторых видах водорослей, наряду с хлорофиллом «а», присутствует хлорофилл «b», но максимум спектра его флуоресценции сдвинут примерно на 20 нм в более короткую область по сравнению с хлорофиллом «а», поэтому детектированию анализата он не мешает [48]. Следует

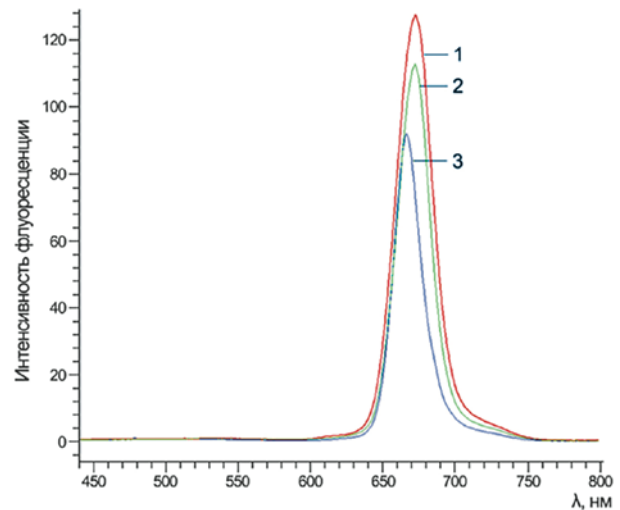


Рис. 1. Спектры флуоресценции растворов хлорофилла «а» (концентрация 6 нг/мл) в хлороформе (1), четыреххлористом углероде (2) и гексане (3).

Fig. 1. Fluorescence spectra of chlorophyll "a" solutions (concentration of 6 ng/ml) in chloroform (1), carbon tetrachloride (2) and hexane (3).

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

Спектры флуоресценции растворов хлорофилла «а» в гексане, четыреххлористом углероде и хлороформе с концентрацией 6 нг/мл, зарегистрированные на спектрофлуориметре RF-5301 PC, при  $\lambda_{\text{возб}} = 418$  нм, показали, что наибольшая интенсивность флуоресценции для раствора хлорофилла «а» наблюдается в хлороформе (рис. 1).

Для оптимизации условий экстракции анализата использовали модельные пробы, приготовленные на дистиллированной воде с известными добавками хлорофилла «а». Для этого в 6 склянок с 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды добавляли по 10 мкг стандарта хлорофилла «а». Экстракцию анализата хлороформом из приготовленных растворов проводили с использованием механического встряхивателя. Из первых трех проб анализат экстрагировали в четыре стадии по 20 минут, добавляя во время первой стадии 20 мл, а затем по 10 мл хлороформа. Из других трех проб анализат экстрагировали хлороформом также в четыре стадии, но продолжительностью в 10 минут, каждый раз добавляя по 10 мл растворителя. После каждой экстракции интенсивность люминесценции полученных экстрактов хлорофилла «а» измеряли на при  $\lambda_{\text{возб}} = 418$  нм и  $\lambda_{\text{люм}} = 675$  нм. Концентрации выделенного хлорофилла «а» определяли по градуировочному графику, построенному по стандартному образцу хлорофилла «а» в хлороформе (рис. 2).

Экспериментальные данные по степени извлечения хлорофилла «а» из воды на различных стадиях экстракции хлороформом приведены на рис. 3. Значения степеней извлечения хлорофилла «а»

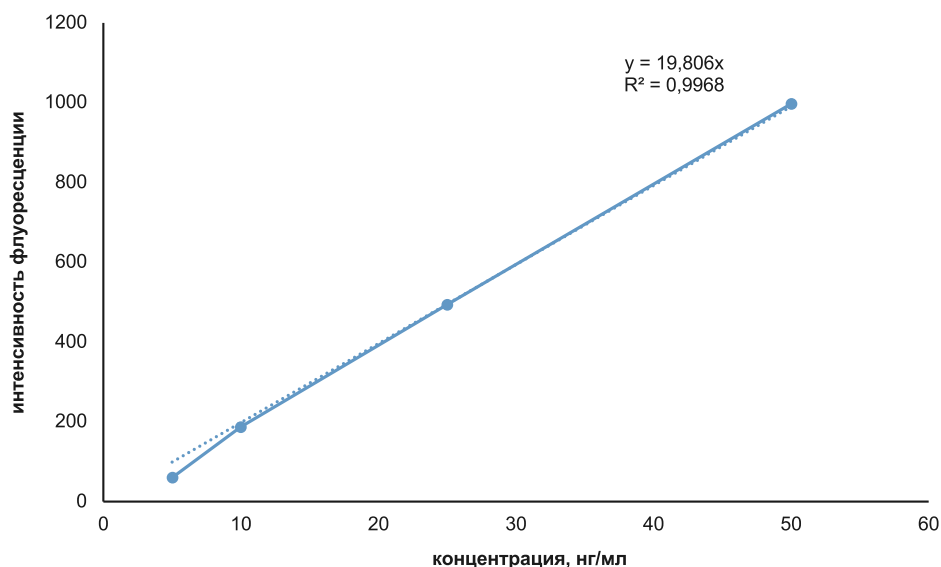


Рис. 2. Градуировочный график зависимости интенсивности флуоресценции хлорофилла «а» в хлороформе от его концентрации.

Fig. 2. Calibration graph of the dependence of the fluorescence intensity of chlorophyll “a” on its concentration in chloroform.

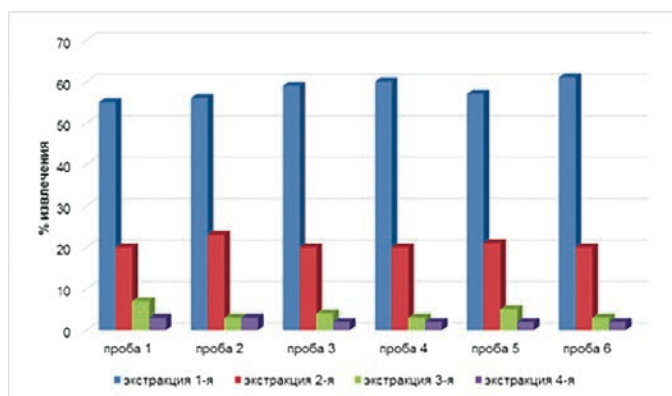


Рис. 3. Степень извлечения хлорофилла «а» из воды хлороформом на различных стадиях экстракции.

Fig. 3. Degree of extraction of chlorophyll “a” from water by chloroform at the various stages of extraction.

хлороформом из разных проб варьировали после первой экстракции от 55 до 61 %, второй – от 20 до 23 %, третьей – от 3 до 7 %, четвертой – от 2 до 3 %. При трехкратной десятиминутной экстракции хлороформом (объемом по 10 мл) извлекается до 85 % хлорофилла «а», содержащегося в исследуемой пробе. При проведении анализа реальных образцов важно влияние анализируемой матрицы – типа вод. Авторы [6-12] достаточно подробно изучили условия экстракции хлорофилла «а» из различных типов вод. Полученные ими и нами данные позволяют утверждать, что соленость воды не ограничивает использование предлагаемой методики, т.к. процедура экстракции аналита нивелирует влияние данного фактора. Это нами экспериментально подтверждено на объектах морских (Азовское море) и пресных вод (р. Дон, Курчанский лиман).

Таблица 3

Определение хлорофилла «а» в модельных пробах воды различными методами

Table 3

Determination of chlorophyll “a” in the model water samples by the various methods

Введено хлорофилла «а», мкг	Флуоресцентный метод		Спектрофотометрический метод (ГОСТ 17.1.4.02-90)	
	найдено		найдено	
	С, мкг/л	%	С, мкг/л	%
0.050	0.042	84	н/обн	-
	0.040	80	н/обн	-
	0.043	86	н/обн	-
0.200	0.210	105	0.330	165
	0.190	95	0.300	150
	0.200	100	0.310	155
0.400	0.400	100	0.560	140
	0.420	105	0.590	147.5
	0.400	100	0.570	142.5

### Апробация экстракционно-флуориметрической методики определения хлорофилла «а»

Проводилось сравнение разработанной экстракционно-флуориметрической и стандартизированной [6] методик определения хлорофилла «а» в пробах воды с известными добавками аналита (табл. 3). Как видно, добавка 0.05 мкг аналита в 1000 см<sup>3</sup> воды обнаруживается только флуориметрическим методом (обнаружено 80-86 % хлорофилла «а»), а спектрофотометрическим методом аналитический сигнал не регистрируется. ГОСТ 17.1.04.02-90 в объектах, в которых возможно мешающее влияние хлорофилла «b» при определении хлорофилла «а», рекомендует дополнительно его учитывать. При концентрациях хлорофилла «а» выше 0.200 мкг спектрофотометрическим методом наблюдаются завышенные концентрации (142.5-165 %), а по предлагаемому варианту экстракционно-флуоресцентной методики наблюдается удовлетворительная сходимость данных (в пределах 95-105 %).

Проводилось также сравнение результатов определения хлорофилла «а» стандартизированной и предложенной нами экстракционно-флуориметрической методик в реальных пробах воды, отобранных в р. Дон, в Курчанском лимане и Таганрогском заливе в осенний период 2017 г. Для этого пробы воды отбирали батометром Молчанова (объем стакана 2000 см<sup>3</sup>) из поверхностного слоя воды, затем каждую пробу воды делили на две части. На месте отбора одну часть (1000 см<sup>3</sup>) фильтровали через мембранный фильтр, фильтры помещали в колбы и фиксировали 90 % ацетоном. Другую часть (1000 см<sup>3</sup>) – сразу после отбора пробы фиксировали 10 мл хлороформа.

Проведение последующих этапов анализа проводили в стационарной лаборатории.

Оптическую плотность ацетоновых экстрактов из фильтров измеряли на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) до подкисления при  $\lambda = 750, 664, 647$  и  $630$  нм, а также после подкисления при  $\lambda = 750$  и  $664$  нм. Интенсивность флуоресценции экстрактов проб, зафиксированных хлороформом, измеряли при  $\lambda_{\text{возб}} = 418$  нм и  $\lambda_{\text{люм}} = 675$  нм. Результаты проведенных измерений сведены в табл. 4. Как видно, расхождения между значениями концентраций хлорофилла «а», полученными спектрофотометрическим и флуоресцентным методами в воде Таганрогского залива составили 8-13 %, в р. Дон – 21-42 %, в Курчанском лимане – 11-25 %. При этом расхождение результатов имело как положительное, так и отрицательное отклонение. Наиболее существенное расхождение отмечено для проб из р. Дон, в которых концентрации хлорофилла «а» были достаточно низкими, но при этом результаты спектрофотометрических определений были существенно выше результатов флуоресцентного метода.

### Метрологические характеристики экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла «а»

По результатам проведенных исследований проведена метрологическая аттестация разработанной методики. При соблюдении всех регламентируемых условий проведения методики измерений характеристики погрешности результатов измерения с вероятностью 0.95 не должны превышать значений, приведенных в табл. 5. Предел определения хлорофилла «а» в пресных и морских водах составляет 0.1 мкг/дм<sup>3</sup>, предел обнаружения – 0.05 мкг/дм<sup>3</sup>.

**Таблица 4**

Концентрации хлорофилла «а» в водах Таганрогского залива, р. Дон и Курчанского лимана, полученные разными методами

**Table 4**

Concentrations of chlorophyll "a" in the waters of the Taganrog Bay, the river Don and the Kurchansky estuary, obtained by the different methods

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

Таблица 5

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

Table 5

Measurement range, values of repeatability, reproducibility and accuracy, with the accepted probability of 0.95

Диапазон концентраций хлорофилла «а», мкг/дм <sup>3</sup>	Показатель повторяемости, $\sigma_r$ , %	Показатель воспроизводимости, $\sigma_R$ , %	Показатель правильности, $\Delta_c$ , %	Показатель точности, $\pm\delta$ , %
От 0.1 до 0.25 включ.	4	5	5	14
Св.0.25 до 5.0 включ.	2	5	3	11

Методика предусматривает поправочные коэффициенты, учитывающие потери хлорофилла «а» при экстракции анализируемой пробы и последующих стадиях анализа, установленные экспериментально добавлением известных количеств хлорофилла «а» к пробам воды. Поправочный коэффициент при концентрации 0.1 мкг/дм<sup>3</sup> равен 1.6, свыше 0.1 до 0.5 мкг/дм<sup>3</sup> – 1.5, свыше 0.5 мкг/дм<sup>3</sup> – 1.3.

При использовании экстракционно-флуориметрической методики определения хлорофилла «а» объем отбираемой пробы воды может варьировать от 100 до 1000 см<sup>3</sup>, в зависимости от трофности водоема. При высокой интенсивности флуоресценции экстрактов хлорофилла «а» необходимо проводить его предварительное разбавление для исключения явления концентрационного тушения.

Методика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла «а» в природных водах (пресных и морских) включена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений под шифром ФР.1.31.2019.33562.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проводились в рамках выполнения гранта РФФИ (№19-43-230003 p\_a) и проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» Кубанского государственного университета.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Current study was supported by the Russian Foundation for Fundamental Research, project no. 19-43-230003 p\_a, and the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project no. 4.2612.2017/PCh; experiments were carried out with the use of scientific equipment of the Ecological and Analytical Center of the Kuban State University.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений / Под ред. А. В. Абакумова. Л.: Гидрометеиздат, 1983. 239 с.
2. Ведерников В. И. Особенности распределения первичной продукции и хлорофилла в Черном море в ве-

сенный и летний периоды // Изменчивость экосистемы Черного моря: естественные и антропогенные факторы. М.: Наука. 1991. С. 128 -147.

3. A review of methods for the analysis of chlorophyll in periphyton and plankton of marine and freshwater systems / C.I. Weber [et al.] // Ohio State University Sea Grant Program Tech Bull. 1986. 54 p.

4. ISO 10260:1992. Water quality, measurement of biochem. parameters; spectrometric determination of the chlorophyll a concentration. Beuth Verlag GmbH. Berlin – Vien – Zurich.

5. РД 52.24.784-2013. Массовая концентрация хлорофилла «а». Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом. ФГБУ «ГХИ». Ростов-на-Дону. 2013. 21 с.

6. ГОСТ 17.1.04.02.90. Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла «а». Государственный контроль качества воды. М. Изд-во стандартов, 2001. 688 с.

7. Iwamura T., Nagai H., Ichimura S. Improved methods for determining contents of chlorophyll, protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid in plankton populations // Int. Revue ges. Hydrobiol. 1970, № 55. P. 131–147.

8. Holm-Hansen O., Riemann B. Chlorophyll a Determination: Improvements in Methodology // Oikos. 1978. V. 30, № 3. P. 438-447.

9. Papisto E., Acs E., Boddill B. Chlorophyll «а» determination with ethanol – a critical test // Hydrobiologia. 2002. V. 485. P. 191-198.

10. Huang T-L, Cong H-B. A new method for determination of chlorophylls in freshwater algae // Environmental monitoring and assessment. 2007. V. 129. P. 1-7.

11. Qiu N., Wang X., Zhou F. A new method for fast extraction and determination of chlorophylls in natural water // Zeitschrift fur Naturforschung. 2017. V. 73. P. 1-10.

12. Optimization of the method for Chlorophyll extraction in Aquatic plants / J.G. Qin [et al.] // Journal of Freshwater Ecology. 2010. V. 25, № 1. P. 531-538.

13. Aminot A., Rey F. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods // ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. 2000. 17 p.

14. Richards F.A., Thompson T.G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments // J. Mar. Res. 1952. V. 11. P. 156-172.

15. Jeffrey S.W., Humphrey G. F. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. 1975. V. 167. P. 191-194.



16. Lorenzen C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations // *Limnology and Oceanography*. 1967. V. 12, № 2. P. 343-346.
17. Ritchie R.J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in nature assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents // *Photosynthetica*. 2008. V. 46. P. 115 – 126.
18. Ritchie R.J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents // *Photosynthetica Research*. 2006. V. 89. P. 27-41.
19. Marker A. F. H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin // *Freshwater Biology*. 1972. V. 2. P. 361–385.
20. Parkin T., Brock T. Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake // *Archiv fur Hydrobiologie*. 1981. V. 91. P. 366–382.
21. Strickland J. D. H., Parsons T.R. A Practical Handbook of Seawater Analysis // *Bulletin Fisheries Research Board of Canada*. Ottawa. 1968. № 167. 311 p.
22. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton / S. W. Wright [et al.] // *Marine ecology progress series*. 1991. V. 77. P. 183-196.
23. Sarmento H., Descy J-P. Use of marker pigments and functional groups for assessing the status of phytoplankton assemblages in lakes // *Journal of Applied Phycology*. 2008. V. 20, № 6. P. 1001–1011.
24. Ediger D., Soydemir N., Kideys A.E. Estimation of phytoplankton biomass using HPLC pigment analysis in the south-western Black Sea // *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2006. V. 53. P. 1911–1922.
25. Maxwell K., Johnson N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide // *Journal of Experimental Botany*. 2000. V.51, № 345. P. 659–668.
26. MacIntyre H.L., Lawrenz E., Richardson T.L. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence // *Chlorophyll fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications in Developments in Applications*. 2010. V. 4. P. 129-169.
27. Ayeni A.O., Adesalu T.A. Validating chlorophyll-a concentrations in the Lagos Lagoon using remote sensing extraction and laboratory fluorometric methods // *MethodsX*. 2018. V. 5. P. 1204-1212.
28. Pinto A.M., Von Sperling E., Moreira R.M. Chlorophyll «a» determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development // *Water Research*. 2001. V. 35. P. 3977–3981.
29. Boulion V.V. Two versions of a balance model to predict the bioproductivity of aquatic ecosystems // *Water Resources*. 2017. V. 44, № 6. P. 820-830.
30. Povazhnyi V.V. Determination of the chlorophyll «a» concentration using a combined method based on measurements with a modified photometer // *Oceanology*. 2012. V. 52, № 4. P. 561-565.
31. Povazhnyi V.V. A fluorometer on the basis of powerful light emitting diodes for determination of the chlorophyll «a» concentration // *Oceanology*. 2014. V. 54, № 3. P. 387-391.
32. Непрерывные измерения океанологических параметров в приповерхностном слое Таганрогского залива. Определение хлорофилла «а» флуориметрическим методом / А.А. Шавыкин [и др.] // *Вестник Южного Научного центра РАН*. 2010. Т. 6, № 3. С. 39-48.
33. SmartFluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chlorophyll a Fluorescence with Smartphones / A. Friedrichs [et al.] // *Sensors*. 2017. V.17, № 4. P. 1–14.
34. Суслин В.В., Чурилова Т. Я., Сосик Х.М. Региональный алгоритм расчета концентрации хлорофилла «а» в Черном море по спутниковым данным SeaWiFS // *Морской экологический журнал*. 2008. Т. 7, № 2. С. 24 - 42.
35. Sayers M.J. A new method to generate a high-resolution global distribution map of lake chlorophyll // *International Journal of Remote Sensing*. 2015. V. 36, № 7. P. 1942 – 1964.
36. Spatial Distribution and Seasonal Dynamics of the Chlorophyll a Concentration in the Sea of Azov Based on MERIS Images / V. V. Saprygin [et al.] // *Oceanology*. 2018. V. 58, № 5. P. 689-699.
37. Комплексный контроль состояния морских акваторий оптическими методами. Часть 4. Опволоконная система измерения концентрации фитопланктона / Ю.Н. Кульчин [и др.] // *Оптика атмосферы и океана*. 2013. Т. 26, № 1. С. 40-45.
38. Estimation of Chlorophyll-a Concentration and the Trophic State of the Barra Bonita Hydroelectric Reservoir Using OLI /Landsat-8 Images / F. Watanabe [et al.] // *International journal of environmental research and public health*. 2015. V.12, № 9. P. 10391-10417.
39. Чурилова Т. Я., Финенко З. З., Тургул С. Поглощение света и максимальный квантовый выход фотосинтеза в период осеннего цветения фитопланктона в Черном море // *Морской экологический журнал*. 2008. Т. 7, № 3, С. 75- 86.
40. Demidov A. B. Seasonal dynamics and estimation of the annual primary production of phytoplankton in the Black sea // *Oceanology*. 2008. V. 48, № 5. P. 664- 678.
41. Comparison of chlorophyll and phaeopigment determinations by spectrophotometric, fluorometric, spectrofluorometric and HPLC methods / J. Neveux [et al.] // *Marine Microbial Food Webs*. 1990. V. 4. P. 217–238.
42. Matthews M.W., Bernard S., Robertson L. An algorithm for detecting trophic status (chlorophyll-a), cyanobacterial dominance, surface scums and floating vegetation in inland and coastal waters // *Remote Sens. Environ*. 2012. V. 124. P. 637 – 652.
43. A hybrid algorithm for estimating the chlorophyll-a concentration across different trophic states in Asian inland waters / B. Matsushita [et al.] // *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*. 2015. V. 102. P. 28 – 37.
44. Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: a critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake / A. Picazo [et al.] // *Limnetica*. 2013. V. 32, № 1. P. 139-158.
45. Matthews M.W. Bio-optical modeling of phytoplankton Chlorophyll – a / *Bio-optical Modeling and Remote Sensing of Inland Waters*. Elsevier. 2017. P. 157-188.
46. Evidence of global chlorophyll d / Y. Kashiya [et al.] // *Science*. 2008. V. 321, № 5889. P. 658-658.
47. Detection of chlorophyll d' and pheophytin a in a chlorophyll d-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina* / M. Akiyama [et al.] // *Analytical Sciences*. 2001. V. 17, № 1. P. 205-208.
48. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? / A. Kume [et al.] // *Journal of Plant research*. 2018. V. 131, № 6. P. 961-972.

## REFERENCES

1. *Rukovodstvo po metodam gidrobiologicheskogo analiza poverhnostnykh vod i donnykh otlozhenii* [Guidelines on methods of hydrobiological analysis of surface water and bottom sediments] / Ed. by A. V. Abakumov. L.: *Gidrometeoizdat*, 1983, 239 p.] (in Russian).

2. Vedernikov V. I. [Features of the distribution of primary production and chlorophyll in the Black Sea in the spring and summer periods]. *Izmenchivost' ekosistemy Chernogo moria: estestvennye i antropogennye faktory* [Variability of the Black Sea ecosystem. Natural and anthropogenic factors]. M.: Nauka, 1991, pp. 128-147 (in Russian).
3. Weber C.I., Fay L.A., Collins G.B., Rathke D.E., Tobin J. A review of methods for the analysis of chlorophyll in periphyton and plankton of marine and freshwater systems. *Ohio State University Sea Grant Program Tech Bull*, 1986, 54 p.
4. ISO 10260:1992. Water quality, measurement of biochem, parameters; spectrometric determination of the chlorophyll a concentration. Beuth Verlag GmbH. Berlin – Wien – Zurich – 9 p.
5. RD 52.24.784-2013. Massovaia koncentratsiia khlorofilla "a". Metodika izmerenii spektrofotometricheskim metodom s ekstraktsiei etanolom. [State standard RD 52.24.784-2013 Mass concentration of chlorophyll "a". Measurement technique by spectrophotometric method with ethanol extraction]. FGBU «GHI». Rostov-na-Donu, 2013, 21 p. (in Russian).
6. GOST 17.1.04.02.90. Voda. Metodika spektrofotometricheskogo opredeleniia khlorofilla «a». [State standard 17.1.04.02.90. Method of measurement spectrophotometric determination of chlorophyll «a»]. Moscow, Izd-vo standartov, 2001. 688 p. (in Russian).
7. Iwamura T., Nagai H., Ichimura S. Improved methods for determining contents of chlorophyll, protein, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid in plankton populations. *Int. Revue ges. Hydrobiol*, 1970, no. 55, pp. 131–147. doi: 10.1002/iroh.19700550106.
8. Holm-Hansen O., Riemann B. [Chlorophyll a Determination: Improvements in Methodology]. *Oikos*, 1978, vol. 30, no. 3, pp. 438-447. doi: 10.2307/3543338.
9. Papisto E., Acs E., Boddill B. Chlorophyll a determination with ethanol – a critical test. *Hydrobiologia*, 2002, vol. 485, pp. 191-198. doi: 10.1023/A:1021329602685.
10. Huang T-L, Cong H-B. A new method for determination of chlorophylls in freshwater algae. *Environmental monitoring and assessment*, 2007, vol. 129, pp. 1-7. doi: 10.1007/s10661-006-9419-y.
11. Qiu N., Wang X., Zhou F. A new method for fast extraction and determination of chlorophylls in natural water. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 2017, vol. 73, pp. 1-10. doi: 10.1515/znc-2017-0157.
12. Qin J. G., Yao W., Zhou Y., Su S. Optimization of the method for Chlorophyll extraction in Aquatic plants. *Journal of Freshwater Ecology*, 2010, vol. 25, no. 1, pp. 531-538. doi: 10.1007/s10750-012-1412-6.
13. Aminot A., Rey F. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, 2000, 17 p.
14. Richards F.A., Thompson T.G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 1952, vol. 11, pp. 156-172.
15. Jeffrey S.W., Humphrey G. F. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 1975, vol. 167, pp. 191-194.
16. Lorenzen C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 1967, vol. 12, no. 2, pp. 343-346.
17. Ritchie R.J. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d and total chlorophylls in nature assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 2008, vol. 46, pp. 115 – 126. doi: 10.1007/s11099-008-0019-7.
18. Ritchie R.J. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthetica Research*, 2006, vol. 89, pp. 27-41. doi: 10.1007/s11120-006-9065-9.
19. Marker A. F. H. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biology*, 1972, vol. 2, pp. 361–385.
20. Parkin T., Brock T. Photosynthetic bacterial production and carbon mineralization in a meromictic lake. *Archiv fur Hydrobiologie*, 1981, vol. 91, pp. 366–382.
21. Strickland J. D. H., Parsons T.R. A Practical Handbook of Seawater Analysis [Bulletin Fisheries Research Board of Canada]. Ottawa, 1968, no. 167, 311 p.
22. Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeta D., Welschmeyer N. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine ecology progress series*, 1991, vol. 77, pp. 183-196. doi: 10.3354/meps077183.
23. Sarmiento H., Descy J-P. Use of marker pigments and functional groups for assessing the status of phytoplankton assemblages in lakes. *Journal of Applied Phycology*, 2008, vol. 20, no. 6, pp. 1001–1011. doi: 10.1007/s10811-007-9294-0.
24. Ediger D., Soydemir N., Kideys A.E. Estimation of phytoplankton biomass using HPLC pigment analysis in the southwestern Black Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2006, vol. 53, pp. 1911 – 1922. doi: 10.1016/j.dsr2.2006.04.018.
25. Maxwell K., Johnson N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, no. 345, pp. 659 – 668. doi: 10.1093/jxb/51.345.659.
26. MacIntyre H.L., Lawrenz E., Richardson T.L. Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence. *Chlorophyll fluorescence in aquatic sciences: Methods and applications in Developments in Applications*, 2010, vol. 4, pp. 129-169. doi: 10.1007/978-90-481-9268-7.
27. Ayeni A.O., Adesalu T.A. Validating chlorophyll-a concentrations in the Lagos Lagoon using remote sensing extraction and laboratory fluorometric methods. *MethodsX*, 2018, vol. 5, pp. 1204-1212. doi: 10.1016/j.mex.2018.09.014.
28. Pinto A.M., Von Sperling E., Moreira R.M. Chlorophyll «a» determination via continuous measurement of plankton fluorescence: Methodology development. *Water Research*, 2001, vol. 35, pp. 3977–3981. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00102-6.
29. Boulion V.V. Two versions of a balance model to predict the bioproductivity of aquatic ecosystems. *Water Resources*, 2017, vol. 44, no. 6, pp. 820-830. doi: 10.7868/S0321059617050029.
30. Povazhnyi V.V. Determination of the chlorophyll "a" concentration using a combined method based on measurements with a modified photometer. *Oceanology*, 2012, vol. 52, no. 4, pp. 561-565. doi: 10.1134/S0001437012040078.
31. Povazhnyi V.V. A fluorometer on the basis of powerful light emitting diodes for determination of the chlorophyll "a" concentration. *Oceanology*, 2014, vol. 54, no. 3, pp. 387-391. doi: 10.1134/S0001437014030102.
32. Shavyikin A.A., Berdnikov S.V., Sapryigin V.V., Verbitskiy R.E. [Continuous measurements of ocean parameters in the near-surface layer of the Taganrog Bay. Determination of chlorophyll "a" by the fluorimetric method]. *Vestnik Juzhnogo Nauchnogo centra RAN*. [Bulletin of the South Science Center]. 2010, vol. 6, no. 3, pp. 39-48 (in Russian).
33. Friedrichs A., Busch J. A., Woerd H.J., Zielinski O. Smart-Fluo: A Method and Affordable Adapter to Measure Chloro-

- phyll a Fluorescence with Smartphones. *Sensors*, 2017, vol. 17, no. 4, pp. 1 – 14. doi: 10.3390/s17040678.
34. Suslin V.V., Churilova T.J., Sosik H.M. [Regional algorithm for calculating the concentration of chlorophyll “a” in the Black Sea using satellite data SeaWIFS]. *Morskoi ekologicheskii zhurnal [Marine Ecological Journal]*, 2008, vol. 7, no. 2. pp. 24 - 42 (in Russian).
35. Sayers M.J. A new method to generate a high-resolution global distribution map of lake chlorophyll. *International Journal of Remote Sensing*, 2015, vol. 36, no.7, pp. 1942 – 1964. doi: 10.1080/01431161.2015.1029099.
36. Saprygin V. V., Berdnikov S. V., Kulygin V. V., Dashkevich L. V., Mestetskiy L. M. Spatial Distribution and Seasonal Dynamics of the Chlorophyll a Concentration in the Sea of Azov Based on MERIS Images. *Oceanology*, 2018, vol. 58, no. 5, pp. 689-699. doi: 10.1134/S0001437018050132.
37. Kulchin Yu N., Voznesenskiy S. S., Gamayunov E. L., Korotenko A. A., Popik A. Yu., Mayor A. Yu. Comprehensive control of the state of marine areas by optical methods. Part 4. Optical fiber system for measuring the concentration of phytoplankton. *Optika atmosfery i okeana [Atmospheric and Oceanic Optics]*, 2013, vol. 26, no. 1, pp. 40-45 (in Russian).
38. Watanabe F., Alcantara E., Rodrigues T., Imai N., Barbosa C., Rotta L. Estimation of Chlorophyll-a Concentration and the Trophic State of the Barra Bonita Hydroelectric Reservoir Using OLI /Landsat-8 Images. *International journal of environmental research and public health*, 2015, vol.12, no. 9, pp. 10391-10417. doi: 10.3390/ijerph120910391.
39. Churilova T. Ja., Finenko Z. Z., Turgul S. [Absorption of light and the maximum quantum yield of photosynthesis during the phytoplankton autumn bloom in the Black Sea]. *Morskoi ekologicheskii zhurnal [Marine ecological journal]*, 2008, vol. 7, no. 3, pp. 75- 86 (in Russian).
40. Demidov A. B. Seasonal dynamics and estimation of the annual primary production of phytoplankton in the Black sea. *Oceanology*, 2008, vol. 48, no. 5, pp. 664- 678. doi: 10.1134/S0001437008050068.
41. Neveux J., Delmas D., Romano J.C., Algagra P., Ignatiades L., Herbland A., Morand P., Neorl A., Bonin D., Barbe J., Sukenik O.A. and Berman T. Comparison of chlorophyll and phaeopigment determinations by spectrophotometric, fluorometric, spectrofluorometric and HPLC methods. *Marine Microbial Food Webs*, 1990, vol. 4, pp. 217–238.
42. Matthews M.W., Bernard S., Robertson L. An algorithm for detecting trophic status (chlorophyll-a), cyanobacterial dominance, surface scums and floating vegetation in inland and coastal waters. *Remote Sens. Environ*, 2012, vol. 124, pp. 637 – 652. doi: 10.1016/j.rse.2012.05.032.
43. Matsushita B. Yu G., Yang W., Oyama Y. Fukushima T. A hybrid algorithm for estimating the chlorophyll-a concentration across different trophic states in Asian inland waters. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2015, vol. 102, pp. 28 – 37. doi: 10.1016/j.isprsjprs.2014.12.022
44. Picazo A., Rochera C., Vicente E., Miracle M.R., Camacho A. Spectrophotometric methods for the determination of photosynthetic pigments in stratified lakes: a critical analysis based on comparisons with HPLC determinations in a model lake. *Limnetica*, 2013, vol. 32, no. 1, pp. 139-158.
45. Matthews M.W. Bio-optical modeling of phytoplankton Chlorophyll – a. *Bio-optical Modeling and Remote Sensing of Inland Waters*. Elsevier, 2017, pp. 157-188. doi: 10.1016/B978-0-12-804644-9.00006-9.
46. Kashiyama Y., Miyashita H., Ohkubo S., Ogawa N.O., Chikaraishi Y., Takano Y., Suga H., Toyofuku T., Nomaki H., Kitazato H., Nagata T., Ohkouchi N. Evidence of global chlorophyll d. *Science*, 2008, vol. 321, no. 5889, pp. 658-658. doi: 10.1126/science.1158761
47. Akiyama M., Miyashita H., Kise H., Watanabe T., Miyachi S., Kobayashi M. Detection of chlorophyll d' and pheophytin a in a chlorophyll d-dominating oxygenic photosynthetic prokaryote *Acaryochloris marina*. *Analytical Sciences*, 2001, vol. 17, no. 1, pp. 205-208. doi: 10.2116/analsci.17.205)
48. Kume A., Akitsu T., Nasahara K. N. Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? *Journal of Plant research*, 2018, vol. 131, no. 6, pp. 961 - 972. doi: 10.1007/s10265-018-1052-7