

БІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 574.64:574.2

DOI: <https://doi.org/10.26565/1992-4259-2019-21-06>

А. Н. КРАЙНЮКОВА¹, д-р биол. наук, проф.
А. Н. КРАЙНЮКОВ², д-р геогр. наук, доц., И. А. КРИВИЦКАЯ²

¹НИУ «Украинский научно-исследовательский институт экологических проблем»
ул. Бакулина, 6, 61166, Харьков, Украина

²Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
площадь Свободы, 6, г. Харьков, 61022

e-mail: biotest.niepkharkiv@meta.ua ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1005-8850>
alkraynukov@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-5264-3118>
ivkrivitska@gmail.com <https://orcid.org/0000-0003-4727-794X>

ИЗУЧЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ОТ ВРЕМЕНИ КОНТАКТА ТОКСИКАНТА С КУЛЬТУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ

Актуальность. Интенсивность фотосинтеза является самым распространенным тестом на токсичность при использовании водорослей в качестве тест-объектов. Все методы определения фотосинтеза основаны на измерении скорости выделения кислорода или поглощения углекислого газа в среде инкубирования до и после определенной экспозиции культуры водорослей на свету.

Цель. Определение пороговых для данного метода концентраций токсичных веществ и изучение зависимости типа доза-величина токсического эффекта.

Методы. Биотестирование с помощью микроводорослей.

Результаты. Биотестирование токсичности методом оценки фотосинтетической активности водорослей возможно только для сточных вод, обладающих острой токсичностью. Прямая зависимость между величиной токсического эффекта и длительностью контакта водорослей с токсикантами наблюдается примерно в течение часа. Дальнейшее увеличение времени контакта почти не повышает токсический эффект.

Выводы. Увеличивая время контакта водорослей с токсикантами, можно в значительной мере повысить чувствительность метода и, возможно, использовать его для оценки слаботоксичных сточных вод. Однако, для окончательных выводов о пределах чувствительности метода, а, следовательно, и области его применения необходимы дополнительные исследования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биотестирование, водоросли, чувствительность, токсиканты, токсический эффект

Krainiukova A. M.

Research Institution «Ukrainian Scientific Research Institute of Ecological Problems»

Krainiukov O. M., Kryvytska I. A.

V. N. Karazin Kharkiv National University

STUDYING THE DEPENDENCE OF THE TOXIC EFFECT ON THE TIME OF THE TOXICANT'S CONTACT WITH THE ALGAE CULTURE

Relevance. The intensity of photosynthesis is the most common toxicity test when using algae as test objects. All methods for determining photosynthesis are based on measuring the rate of oxygen evolution or absorption of carbon dioxide in an incubation medium before and after a certain exposure of algae culture to light.

Purpose. Determination of threshold concentrations of toxic substances for this method and study of the dependence of the type of dose-value of the toxic effect.

Methods. Biotesting with the help of microalgae.

© Крайнюкова А. Н., Крайнюков А. Н., Кривицкая И. А., 2019



This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Results. Toxicity bioassay by evaluating the photosynthetic activity of algae is possible only for wastewater with acute toxicity. A direct dependency between the magnitude of the toxic effect and the duration of contact of algae with toxicants is observed for about an hour. A further increase in the contact time almost does not increase the toxic effect.

Conclusions. By increasing the contact time of algae with toxicants, it is possible to significantly increase the sensitivity of the method and, possibly, use it to evaluate low-toxic wastewater. However, for the final conclusions about the limits of sensitivity of the method, and, therefore, about the scope of its application, additional studies are needed.

KEYWORDS: bioassay, algae, sensitivity, toxicants, toxic effect

Крайнюкова А. М.

Науково-дослідна установа «Український науково-дослідний інститут екологічних проблем»

Крайнюков О. М., Кривицька І. А.

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

ВИВЧЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ ТОКСИЧНОГО ЕФЕКТУ ВІД ЧАСУ КОНТАКТУ ТОКСИКАНТІВ З КУЛЬТУРОЮ ВОДОРОСТІ

Актуальність. Інтенсивність фотосинтезу є найпоширенішим тестом на токсичність при використанні водоростей в якості тест-об'єктів. Всі методи визначення фотосинтезу засновані на вимірі швидкості виділення кисню або поглинання вуглекислого газу в середовищі інкубації до і після певної експозиції культури водоростей на світлі.

Мета. Визначення порогових для даного методу концентрацій токсичних речовин і вивчення залежності типу доза-величина токсичного ефекту.

Методи. Біотестування за допомогою мікроводоростей.

Результати. Біотестування токсичності методом оцінки фотосинтетичної активності водоростей можливо тільки для стічних вод, що володіють гострою токсичністю. Пряма залежність між величиною токсичного ефекту і тривалістю контакту водоростей з токсикантами спостерігається приблизно протягом години. Подальше збільшення часу контакту майже не підвищує токсичний ефект.

Висновки. Збільшуючи час контакту водоростей з токсикантами, можна значною мірою підвищити чутливість методу і, можливо, використовувати його для оцінки слаботоксичних стічних вод. Однак, для остаточних висновків про межі чутливості методу, а, отже, і про область його застосування необхідні додаткові дослідження.

Ключові слова: біотестування, водорості, чутливість, токсиканти, токсичний ефект

Введение

Негативные последствия загрязнения водной среды возникают в результате воздействия различных веществ на биоту, в том числе на фотосинтезирующие организмы, являющиеся основными продуцентами органического вещества в водоемах и участвующие в процессах их самоочищения. Нарушение их жизнедеятельности может изменить функционирование всей экосистемы. Поэтому для мониторинга состояния окружающей среды в условиях антропогенного воздействия актуальна разработка новых и совершенствование уже существующих методов биоиндикации и биотестирования именно с использованием растительных организмов. Качество воды в открытых водоемах определяется по органолептическим, гидрохимическим и биологическим показателям. Разнообразные физико-химические методы позволяют с высокой степенью точности оценивать качественный и количественный гидрохимический

состав воды. Но с помощью этих методов невозможно охарактеризовать реальные последствия загрязнения для гидробионтов. Кроме того, химические соединения, попадая в водную среду, трансформируются под влиянием различных абиотических факторов, в основном физических (осаждение, адсорбция, улетучивание) и химических (диссоциация, гидролиз, комплексообразование, окислительно-восстановительные реакции). Большое значение в трансформации веществ имеет биологический фактор, связанный с жизнедеятельностью гидробионтов, поэтому не всегда можно предугадать, в какой форме вещество воздействует на живые организмы [1].

Анализ результатов последних исследований. Для наиболее адекватной оценки токсичности водной среды для гидробионтов применяют метод биотестирования, позволяющий определить с помощью тест-объектов опасность исследуемого фак-

тора для жизнедеятельности биосистем [2,3]. Правильный выбор организмов для целей биотестирования является одной из важнейших прикладных задач водной токсикологии. Биологический объект, выбираемый в качестве тест-организма, должен удовлетворять ряду критериев, в том числе должен быть доступным, экономичным и простым для выполнения процедур биотестирования [4]. Основным требованием к тест-организму являются его чувствительность и представительность.

Одной из главных характеристик методик биотестирования является чувствительность организмов, используемых в качестве тест-объектов, на присутствие в среде их обитания химических веществ токсического действия. Понятие чувствительности организмов имеет два аспекта - качественный и количественный. В качественном отношении чувствительность означает способность функций организма отвечать на воздействие химических веществ. В количественном отношении чаще чувствительность используется для сопоставления реактивности различных организмов, функций и процессов на вредные воздействия. Один организм считается более чувствительным, чем другой, если нарушение его функций происходит раньше, при меньших концентрациях или выраженность таких нарушений проявляется раньше [5,6].

Незаменимыми тест-объектами в любой системе биотестирования являются микроводоросли, которые обладают коротким жизненным циклом и поэтому позволяют за небольшой срок проследить воздействие токсических веществ в ряду поколений и оценить отдаленные последствия интоксикации. Преимуществом микроводорослей при решении проблем контроля качества водной среды является также возможность изучения действия токсикантов как на клеточном, так и на популяционном уровне [7]. Несмотря на то, что методики определения токсичности для микроводорослей стандартизированы, существуют большие межвидовые различия в чувствительности по отношению к одному и тому же веществу [8]. Поэтому для наиболее точного определения опасности загрязнения окружающей среды необходимо проводить оценку токсичности с использованием большого набора тест-организмов.

Микроводоросли давно служат объектами исследования при изучении и моделировании разнообразных процессов, для решения прикладных и фундаментальных задач. Понятие «микроводоросли» включает в себя как одноклеточные формы, так и многоклеточные (например, сине-зеленые нитчатые, или цианобактерии - *Oscillatoria*, *Anabaena*). Изучение одноклеточных водорослей более предпочтительно, поскольку они сочетают в себе свойства отдельных клеток, но реагируют на внешнюю среду как самостоятельный организм [9]. Микроводоросли служат удобным модельным объектом для изучения механизмов дыхания и фотосинтеза, подбора условий для максимальной продуктивности в работе фотосинтетического аппарата, что также играет важную роль в разработке эффективных систем по получению биотоплива [10]. Исследования проводят на альгологически чистых культурах, применение которых, впервые опробованное известным голландским бактериологом Бейеринком, а в настоящее время практикуется повсеместно в лабораториях всего мира. Высокое содержание большого количества различных веществ (аминокислот, макро- и микроэлементов, пигментов, масел и др.) в клетках микроводорослей делает их ценным ресурсом для решения целого ряда медико-биологических, фармацевтических и химических производств. Роль микроводорослей в биотехнологии связана в первую очередь с разработкой процессов направленного биосинтеза, с помощью которых возможно регулирование образования микроводорослями тех или иных веществ. Клетки микроводорослей богаты маслами, что делает их перспективным сырьем для получения биотоплива. Более того, биотопливо, получаемое из водорослей, отличается высокой степенью биodeградации, нетоксично и не содержит серы. В настоящее время ведется большое количество генно-инженерных исследований по изучению возможностей модификации генома микроводорослей с целью эффективного получения биотоплива. Широкое применение микроводорослей в сфере охраны окружающей среды обусловлено возможностью проследить воздействие неблагоприятного фактора на популяцию в целом на протяжении многих поколений и выявить отдаленные последствия [11]. Исследования чувствительности

микроводорослей к 16 различным воздействиям требуют поиска видов-индикаторов загрязнения и видов, способных к быстрому поглощению, инактивации и утилизации загрязняющих веществ в водоемах (биоремедиации). Водоросли, обладающие высо-

кой чувствительностью даже к низким концентрациям тяжелых металлов, как, например, *Chlamydomonas renhardtii*, хорошо подходят на роль биосенсора при загрязнении воды, однако слишком чувствительны для целей биоремедиации.

Методика исследований

Определение качества воды с помощью микроводорослей в обязательном порядке входит в процедуру биотестирования во всех странах мира. Микроводоросли также являются неотъемлемым звеном при разработке стандартов качества воды. Культуры микроводорослей применяют и для диагностики состояния почв, где с их помощью проводят определение степени плодородия (обеспеченность почвы питательными веществами и микроэлементами) либо токсичность почвы, если имеет место какое-либо загрязнение. Состояние почвы оценивают по реакции водорослей, непосредственно в ней обитающих, на добавление различных удобрений или же с помощью тест-культур водорослей [12]. Обладая сходной с высшими растениями физиологией, водоросли проявляют сходные с ними реакции на изменение условий среды, что особенно ценно для объективной оценки почвы как хозяйственного ресурса. В последнее время, в связи со значительным увеличением электромагнитного фона Земли, микроводоросли все чаще выступают тест-объектами при исследовании влияния электромагнитного излучения на гидробионты и качество среды их обитания [13]. Восприимчивость организма к различным воздействиям изменяется в процессе его онтогенеза и зависит от стадии развития и физиологического состояния. Есть данные,

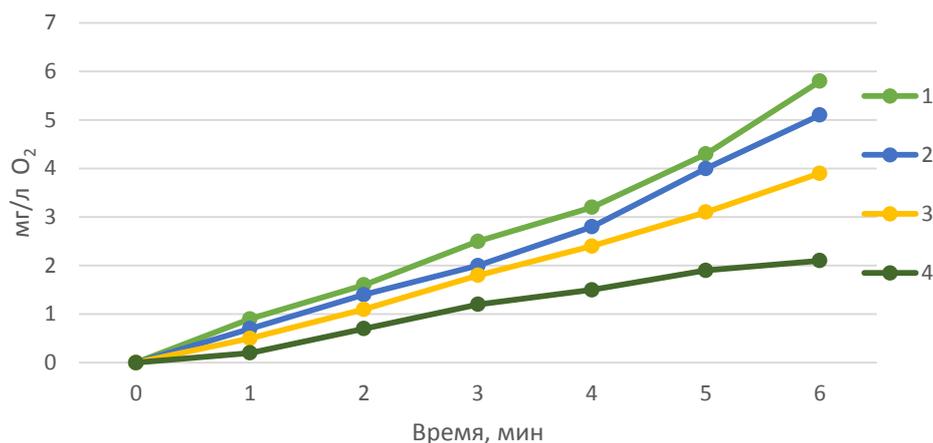
что в экспоненциальной фазе роста культуры водорослей обладает повышенной чувствительностью, тогда как в период стационарной фазы устойчивость культуры значительно повышается [14]. Помимо процессов внутренней регуляции, развитие культуры микроводорослей обусловлено воздействием внешних факторов. Водоросли быстро реагируют на изменение условий выращивания, поэтому для проведения испытаний требуется строгий контроль параметров культивирования. Например, повышение температуры до 25°C усиливает токсическое действие веществ, а при понижении температуры до 12-15°C, наоборот, оно проявляется слабее и с задержкой во времени. Большое значение для результата токсикологического эксперимента имеет исходная плотность клеток. Высокая плотность при продолжительном испытании может повлиять на химические процессы, свойства, токсичность и биодоступность тестируемых веществ, что происходит из-за изменения рН культивируемой среды вследствие выработки водорослями большого количества углекислого газа [15]. Часто этот показатель завышен по сравнению с численностью клеток водорослей в природных местообитаниях, что обусловлено невозможностью измерить результат эксперимента при более низких плотностях.

Результаты и их обсуждение

При изучении влияния токсикантов на интенсивность фотосинтеза водорослей преследовались две цели: определить пороговые для данного метода концентрации токсичных веществ и изучить зависимость типа доза-величина токсического эффекта. В качестве токсикантов были испытаны: медь в виде CuSO_4 и гербицид пропанид.

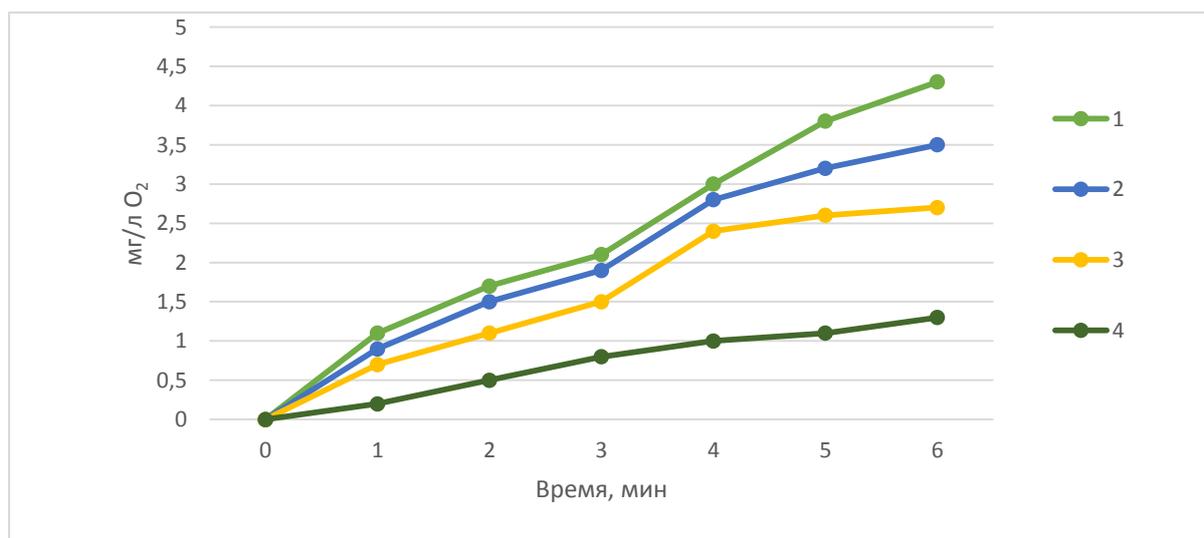
Значение пороговых для данного метода концентраций токсикантов, то есть

минимальных концентраций, вызывающих токсический эффект, будут в значительной мере определять область использования метода для оценки токсического эффекта. Анализ графиков на рис. 1 и 2 показывает, что пороговые концентрации зависят прежде всего от природы токсиканта. Так, пороговая концентрация меди для *Sc. quadricauda* составляет 6 мг/л при времени контакта водорослей с токсикантов,



1 – контроль; 2 – культура + 6 мг/л Cu⁺²; 3 – культура + 12 мг/л Cu⁺²; 4 – культура + 24 мг/л Cu⁺².
Время контакта водорослей с токсикантом – 6 мин.

Рис. 1 – Влияние меди на интенсивность фотосинтеза *Sc. quadricauda*



1 – контроль; 2 – культура + 0,25 мг/л пропанида; 3 – культура + 0,5 мг/л пропанида; 4 – культура + 1 мг/л пропанида. Время контакта водорослей с токсикантом – 6 мин.

Рис. 2 – Влияние пропанида на интенсивность фотосинтеза *Chl. Vulgaris*

равном 6 минутам (включая время измерения).

Для пропанида пороговая концентрация составляет 0,25 мг в дм³ в случае использования *Chl. vulgaris* (рис. 2). В то же время, пороговая концентрация пропанида для *Sc. quadricauda* составляет около 0,125 мг/л, то есть в 2 раза ниже, чем для *Chl. vulgaris*. Сточные воды металлургического производства вызывают снижение интенсивности фотосинтеза у *Sc. quadricauda* вплоть до разбавления их в 80 раз.

Таким образом, можно предварительно заключить, что биотестирование токсичности методом оценки фотосинтетической активности водорослей возможно только для сточных вод, обладающих острой токсичностью. Однако, этот вывод справедлив только для используемых нами видов водорослей и использованной методики оценки токсичности. Не исключена возможность, что использование других, более чувствительных тест-объектов, а также других режимов оценки токсичности, позволит суще-

ственно повысить чувствительность метода. Выбор чувствительных тест-объектов не входил в задачу данной работы. Другим способом повышения чувствительности метода является увеличение времени контакта водорослей с токсикантом. Ниже мы приводим результаты экспериментов по изучению зависимости время контакта – токсический эффект.

Для экспресс-оценки токсичности важное значение имеет такая характеристика тестируемой реакции как ее “инерционность”. Под инерционностью тест-реакции в данном случае нужно понимать промежуток времени между началом воздействия токсиканта и появлением изменений в тестируемой реакции. Инерционность той или иной физиологической реакции тест-объекта обуславливается как ее ролью и местом в общей системе физиолого-биохимических процессов, протекающих в организме тест-объекта, так и природой токсиканта. Одна и та же реакция может быть инерционной или не инерционной в зависимости от характера токсического воздействия, поэтому понятие “инерционности” реакции нельзя рассматривать вне связи между химическим составом токсиканта, механизмом его действия и изменением других показателей, характеризующих физиологическое состояние тест-объекта. В литературе имеется мало данных, которые позволяли бы дать сравнительную характеристику инерционности ответных реакций водорослей на токсическое воздействие. При изучении токсического действия ряда

тяжелых металлов на фотосинтез, ионный обмен и азотфиксацию у водоросли *Anabaena spiroides*. По данным, приведенным в этой работе, фотосинтез и азотфиксация являются гораздо более инерционными тест-реакциями, чем ионный обмен.

У инерционных тестовых реакций должна наблюдаться пропорциональная зависимость между временем контакта тест-объекта с токсикантом и величиной токсического эффекта. Так как для экспресс-методов оценки токсичности сточных вод время контакта тестовых организмов со сточными водами желательнее свести к минимуму, то используемая тестовая реакция должна обладать малой инерционностью. В то же время, увеличивая время контакта, можно обнаруживать токсический эффект более низких концентраций токсикантов.

На рис. 3 и 4 представлены графики, характеризующие зависимость фотосинтеза *Sc. quadricauda* и *Chl. vulgaris* от времени контакта этих водорослей с токсикантами. Как видно из этих графиков, с увеличением времени контакта токсический эффект меди в концентрации 3 мг/л начинает сказываться только спустя 20 минут после введения токсиканта в культуру водорослей (рис. 5). С увеличением времени контакта до 1 часа величина токсического эффекта возрастает и через 60 минут фотосинтез водорослей в опыте составляет около 50% от контроля. Отметим, что пороговая концентрация меди для *Sc. quadricauda* при времени контакта, равном 7 минутам, составляет около 6 мг/л (рис. 3).

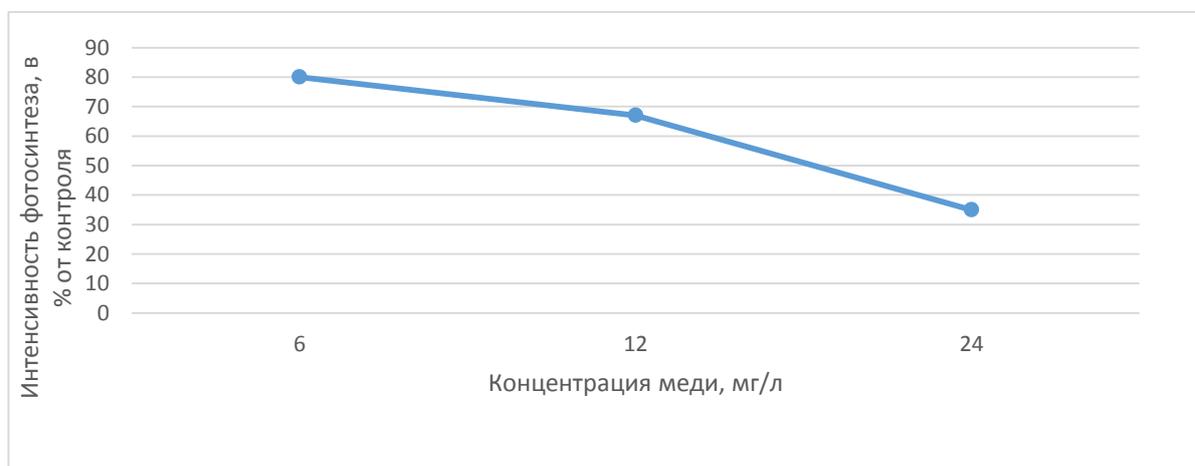


Рис. 3 – Зависимость фотосинтеза *Sc. quadricauda* от концентрации меди (доза-эффект)
Время контакта водорослей с токсикантом – 7 мин

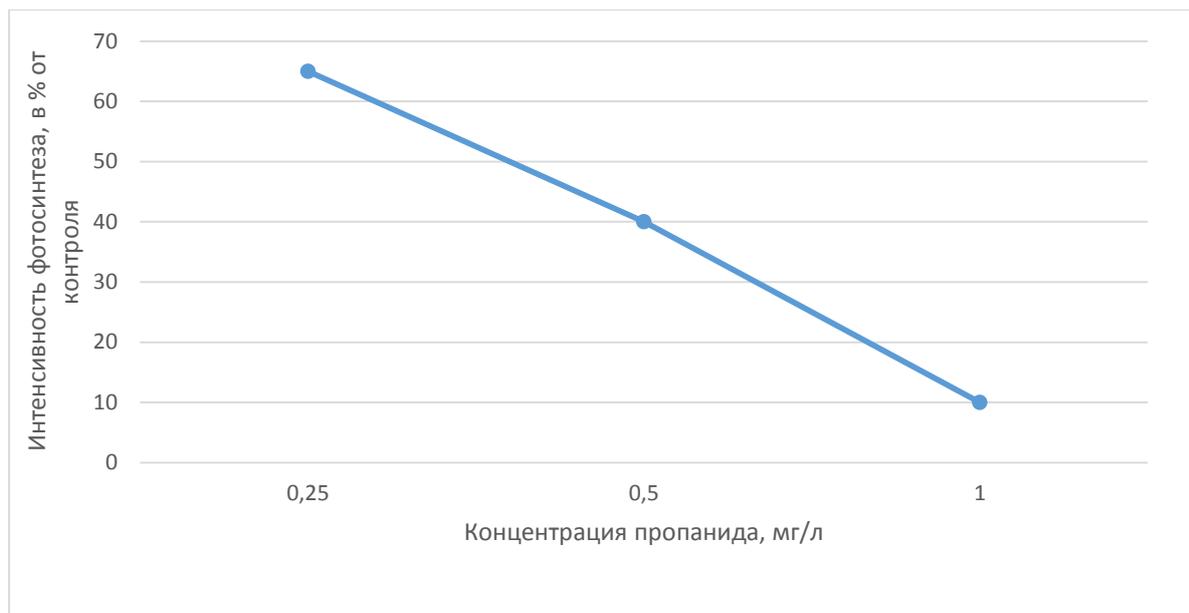
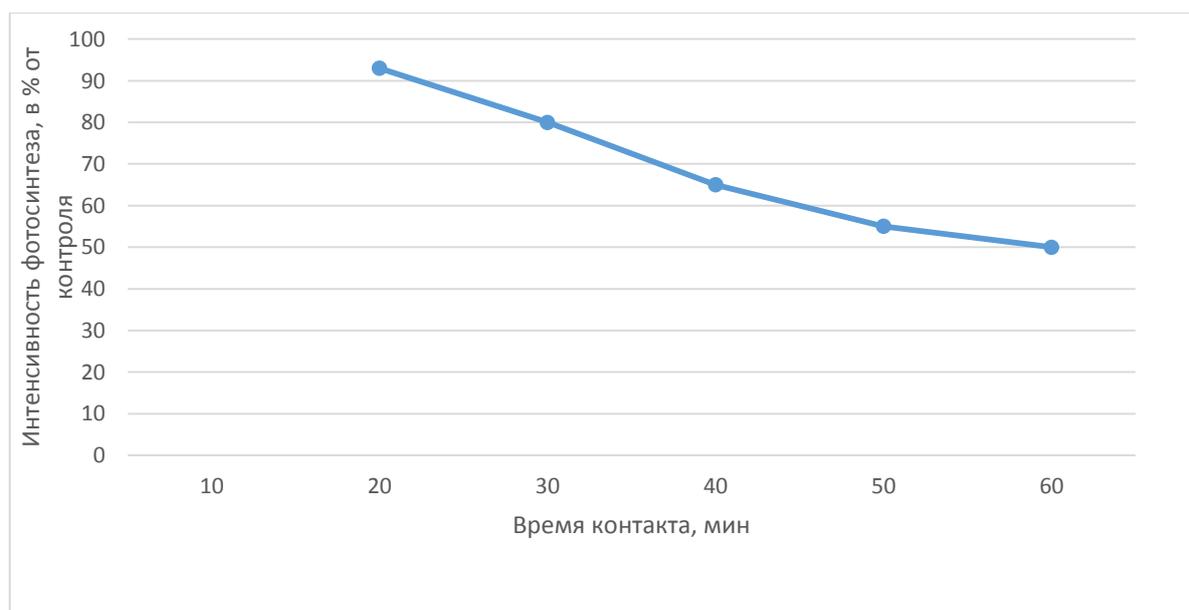


Рис. 4 – Зависимость фотосинтеза *Chl. Vulgaris* от концентрации пропанида
Время контакта водорослей с токсикантом – 7 мин

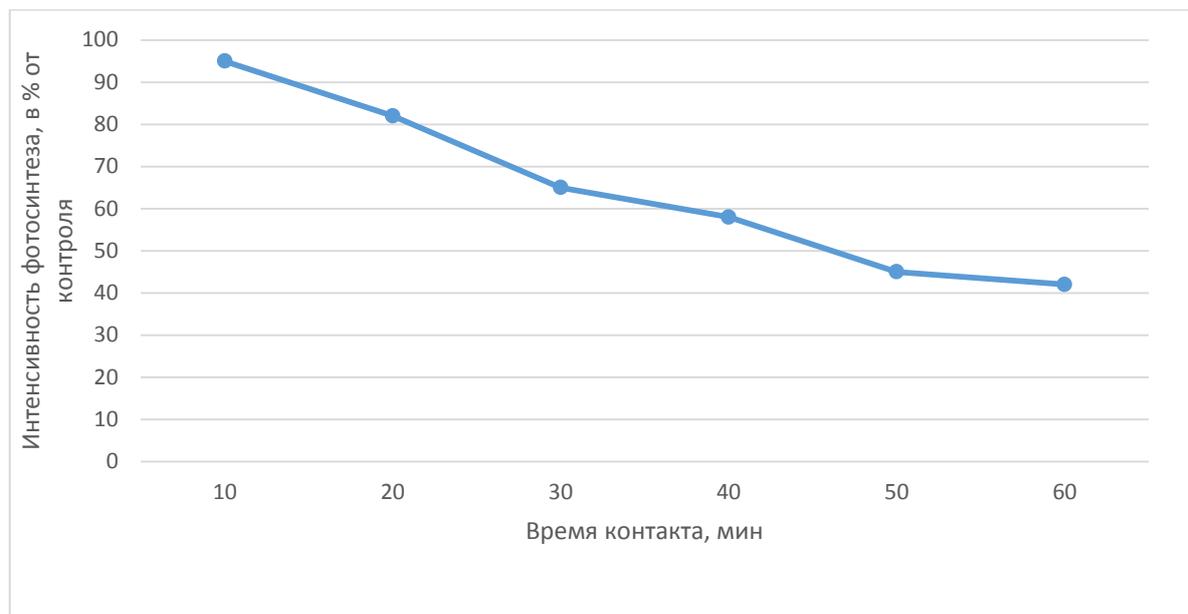


Токсикант – медь в концентрации 3 мг/л.

Рис. 5 – Зависимость фотосинтеза *Sc. quadricauda* от времени контакта с токсикантом
(зависимость время контакта - токсический эффект)

Повышение токсического эффекта с увеличением времени контакта наблюдается и у *Chl. vulgaris* при действии пирамидина в концентрации 2,5 мг/л (рис. 6). Исходя из данных, приведенных на графиках, можно сделать вывод, что прямая зависимость

между величиной токсического эффекта и длительностью контакта водорослей с токсикантами наблюдается примерно в течение часа. Дальнейшее увеличение времени контакта почти не повышает токсический эффект.



Токсикант – пирамин в концентрации 2,5 мг/л.

Рис. 6 – Зависимость фотосинтеза *Chl. Vulgaris* от времени контакта с токсикантом (зависимость время контакта - токсический эффект)

Выводы

Интенсивность фотосинтеза является самым распространенным тестом на токсичность при использовании водорослей в качестве тест-объектов. Все методы определения фотосинтеза основаны на измерении скорости выделения кислорода или поглощения углекислого газа в среде инкубирования до и после определенной экспозиции культуры водорослей на свету. Уве-

личивая время контакта водорослей с токсикантами, можно в значительной мере повысить чувствительность метода и, возможно, использовать его для оценки слабotoксичных сточных вод. Однако, для окончательных выводов о пределах чувствительности метода, а, следовательно, и области его применения необходимы дополнительные исследования.

Литература

1. Филенко О. Ф. Водная токсикология. Черноголовка: ОИХФ АН СССР, 1988. 155.
2. Патин С. А. Эколого-токсикологические аспекты изучения и контроля качества водной среды. *Гидробиол. журн.* 1991. Т. 2. Вып. 6. С. 71-75.
3. Патин С. А. Эколого-токсикологические подходы к оценке воздействия на морскую среду и биоресурсы. *Актуальные проблемы водной токсикологии.*/под ред. Б. А. Флерова. Борок: Рыбинский дом печати, 2004. С. 34-60.
4. Крайнюков А. Н., Крайнюкова А. Н., Чистякова Е. О. Мониторинг возвратных вод химического предприятия и качества воды в контрольных створах водного объекта. *Проблеми охорони навколишнього природного середовища та екологічної безпеки.* Харків, 2012. Вип. 35. С. 51-60.
5. Крайнюков О. М. Біоекологічні методи дослідження аквальных ландшафтів. *Фізична географія та геоморфологія.* 2013. Вип. 3 (71). С. 158-167.
6. Крайнюков О. М., Кривицька І. А. Встановлення нормативів екологічної безпеки рибогосподарського водокористування на основі ландшафтно-екологічного підходу (на прикладі морфоліну). *Молодий вчений.* 2016. №12. С. 15-18.
7. Nikoogar K., Moradshahi A., Hosseini L. (2005) Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol. Eng.* 22. P. 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.07.001>

8. Beneche G. Automatisierung der auswertung einer algenheteste hemmung der kreibenbewegung einer blaualge (*Phorodium sp.*) durch deigat. *Z. Waasser und Abwasser-Forsch.* 1977, №6. P. 195-197.
9. Raso J., Rachlin I. The effect of cadmium, copper, mercuru, zincum and lead on cell division growth and chlorophyll a content a content of the chlorophyte *Chl. vulgaris*. *Bull. Torreu. Bot. Club.* 1977. №3. P. 226-233.
10. Garcíarios V, Freilepelegrín Y, Robledo D, Mendoza-cózatl D, Moreno-sánchez R, Gold-bouchot G. (2007) Cell wall composition affects Cd²⁺ accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. *Aquatic Toxicol.* Vol 81. P:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.001>
11. Брагинский Л. П. Некоторые итоги исследований по водной токсикологии в Украине. *Актуальные проблемы водной токсикологии.* /под ред. Б. А. Флерова. Борок: Рыбинский дом печати, 2004. С. 11-33.
12. Cullimore, D. R. A qualitative method of assessing the available nitrogen, potassium and phosphorus in the soil. *J. Sci. Food Agric.*, 1996, Vol. 17. P. 321-323. doi:[10.1002/jsfa.2740170709](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170709).
13. Radix P, Leonard M, Papantoniou C et al. Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2000. Vol.47. P.186–194.
14. María Elena Sáenz, Walter Darío Di Marzio and Jose Luis Alberdi, (2012) Assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012., Vol. 104, No1. P. 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.001>
15. Heijerick D. G., Bossuyt B. T. A., De Schampelaere K. A. C., Indeherberg M., Mingazzini M. and Janssen C.R., (2005) Effect of Varying Physicochemistry of European Surface Waters on the Copper Toxicity to the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ecotoxicology*. 2005. Vol. 14. No 6. P. 661-670. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0014-8>

References

1. Filenko, O. F. (1988). Aquatic toxicology. Chernogolovka: Institute of Problems of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences, 155. (In Russian).
2. Patin, S. A. (1991). Ecological and toxicological aspects of the study and quality control of the aquatic environment. *Hydrobiological journal*, 2 (6), 71-75. (In Russian).
3. Patin, S. A. (2004). Ecological and toxicological approaches to assessing the impact on the marine environment and biological resources. *Actual problems of aquatic toxicology*, Borok: Rybinsk Printing House, 34-60. (In Russian).
4. Krajnyukov, A. N., Krajnyukova, A. N., Chistyakova, E. O. (2012). Monitoring the return water of a chemical plant and the quality of water in the control sections of a water body. *Problems of environmental protection and ecological safety*, 35, 51-60. (In Russian).
5. Krainiukov, O. M. (2013). Bioecological methods for the study of aquatic landscapes. *Physical Geography and Geomorphology*, 3 (71), 158-167. (In Ukrainian).
6. Krainiukov, O. M., Kryvytska, I. A. (2016). Establishment of ecological safety standards for fishery water management based on landscape ecological approach (on the example of morpholine). *Young scientist*, 12, 15-18. (In Ukrainian).
7. Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L. (2005). Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol. Eng.*, 22, 141-146. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.07.001>
8. Beneche, G. (1977). Automatisierung der auswertung einer algenheteste hemmung der kreibenbewegung einer blaualge (*Phorodium sp.*) durch Digit. *Z. Waasser und Abwasser-Forsch.*, (6), 195-197.
9. Raso, J., Rachlin, I. (1977). The effect of cadmium, copper, mercuru, zincum and lead on cell division growth and chlorophyll a content a content of the chlorophyte *Chl. vulgaris*. *Bull. Torreu. Bot. Club.*, (3), 226-233.
10. Garcíarios V, Freilepelegrín Y, Robledo D, Mendoza-cózatl D, Moreno-sánchez R, Gold-bouchot G. (2007). Cell wall composition affects Cd²⁺ accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. *Aquatic Toxicol*, 81, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.001>
11. Braginskij, L. P. (2004). Some results of studies on aquatic toxicology in Ukraine. *Actual problems of aquatic toxicology*. Borok, 11-34. (In Russian).
12. Cullimore, D. R. (1966). A qualitative method of assessing the available nitrogen, potassium and phosphorus in the soil. *J. Sci. Food Agric.*, 17, 321-323. Available at: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170709>
13. Radix, P., Leonard, M., Papantoniou, C. et al (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 47, 186–194.
14. María Elena Sáenz, Walter Darío Di Marzio and Jose Luis Alberdi (2012). Assessment of Cyfluthrin commercial formulation on growth, photosynthesis and catalase activity of green algae, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104 (1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.001>
15. Heijerick, D. G., Bossuyt, B. T. A., De Schampelaere, K. A. C., Indeherberg, M., Mingazzini, M. and Janssen, C. R. (2005). Effect of Varying Physicochemistry of European Surface Waters on the Copper Toxicity to the Green Alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology*, 14 (6), 661-670. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0014-8>