

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Федеральный исследовательский центр  
«Институт биологии южных морей имени А.О.Ковалевского РАН»

*На правах рукописи*

**ШОМАН НАТАЛЬЯ ЮРЬЕВНА**

**СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТА, ТЕМПЕРАТУРЫ И  
ОБЕСПЕЧЕННОСТИ АЗОТОМ НА СКОРОСТЬ РОСТА И СОДЕРЖАНИЕ  
ХЛОРОФИЛЛА *a* У МОРСКИХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

Специальность

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
Финенко Зосим Зосимович

Севастополь - 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Скорость роста как основной экологический показатель динамики численности фитопланктона .....	11
1.1.1 Роль интенсивности света в общей изменчивости скорости роста водорослей .....	12
1.1.2 Влияние температуры на ростовые показатели водорослей .....	19
1.1.3 Скорость роста водорослей и обеспеченность клеток минеральным азотом .....	22
1.2 Содержание хлорофилла <i>a</i> в клетке как отражение условий роста водорослей .....	27
1.2.1 Влияние основных абиотических факторов на изменение отношения <i>C/Xл a</i> у микроводорослей .....	28
1.2.2 Основные подходы к моделированию содержания хлорофилла <i>a</i> в клетках водорослей в зависимости от условий роста .....	32
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	39
2.1 Систематическое положение исследуемых объектов .....	39
2.2 Условия проведения экспериментов .....	41
2.3 Методы измерений .....	46
ГЛАВА 3 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ .....	54
3.1 Зависимость удельной скорости роста водорослей от температуры в условиях светового лимитирования .....	56
3.2 Изменение максимальной удельной скорости роста водорослей в зависимости от температурных условий культивирования .....	58
3.3 Влияние температуры на рост водорослей в условиях высокой	

освещенности .....	61
ГЛАВА 4 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОТНОШЕНИЕ УГЛЕРОДА К ХЛОРОФИЛЛУ У ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ .....	69
4.1 Влияние температуры на изменение параметров С/Хл-І зависимости у <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Nitzschia sp. № 3</i> и <i>Skeletonema costatum</i> .....	69
4.1.1 Влияние температуры на изменение отношения углерода к хлорофиллу <i>a</i> в клетках при световом лимитировании роста водорослей .....	72
4.1.2 Влияние температуры на изменение С/Хл-І зависимости в условиях светового насыщения роста водорослей .....	75
4.1.3 Влияние температуры на изменение отношения С/Хл <i>a</i> в условиях светового ингибирования .....	78
4.2 Изменение содержания хлорофилла <i>a</i> в клетках <i>Phaeodactylum tricornutum</i> при экстремально низкой освещенности .....	83
4.3 Влияние фотоадаптации на удельную скорость роста и отношение органического углерода к хлорофиллу <i>a</i> у диатомовой водоросли <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	85
ГЛАВА 5 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И СТЕПЕНИ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ АЗОТОМ НА СКОРОСТЬ РОСТА И ОТНОШЕНИЕ С/Хл <i>a</i> У ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (НА ПРИМЕРЕ <i>PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM</i> ) .....	93
5.1 Динамика внутриклеточного содержания углерода, азота и хлорофилла в условиях накопительного роста водорослей при разной интенсивности света .....	93
5.2 Влияние температуры на С/Ν и С/Хл <i>a</i> отношения в клетках водорослей при разной освещенности .....	100
5.3 Закономерности изменения удельной скорости роста и содержания хлорофилла <i>a</i> у <i>Phaeodactylum tricornutum</i> в зависимости от концентрации азота в питательной среде и световых условий культивирования .....	105

ГЛАВА 6 ОЦЕНКА ОТНОШЕНИЯ $C/X_{л a}$ В КЛЕТКАХ ЧЕРНОМОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА В ЗИМНЕ-ВЕСЕННИЙ ПЕРИОД ...	113
ВЫВОДЫ .....	125
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** Вопрос влияния факторов среды на физиологическое состояние водорослей не нов и привлекает огромный интерес исследователей на протяжении последних 50 лет. Тем не менее, понимание принципов и механизмов адаптации фотосинтезирующих растений к изменяющимся условиям внешней среды до сих пор остается одним из основополагающих и актуальных вопросов современной гидробиологии. К настоящему времени накоплен обширный материал по влиянию условий освещения [60, 80, 84, 134, 163, 166], температуры [1, 75, 123, 142, 153] и степени обеспеченности азотом [129, 162, 163] на скорость роста и содержание хлорофилла в клетках водорослей. Однако большинство работ посвящено изучению эффекта, возникающего при изменении одного фактора, тогда как остальные остаются постоянными на оптимальном уровне. В то же время в природных условиях на рост водорослей влияет целый комплекс факторов и нередко при изменении одного из них изменяется действие другого. Исследований в этом направлении гораздо меньше [61, 74, 76, 89, 97] и они, как правило, ограничены узким диапазоном варибельности изучаемых факторов.

Скорость роста является одной из основополагающих функциональных характеристик фитопланктона, определяющих пространственно-временную изменчивость величины его биомассы и продукции в морских и пресноводных экосистемах [84]. Световые зависимости скорости роста, полученные при разной температуре и разной обеспеченности клеток азотом, отражают характер работы фотохимических систем и ферментативного аппарата клеток в различных условиях культивирования водорослей и являются важным инструментом для моделирования и понимания динамики развития фитопланктона [164].

Измерение концентрации хлорофилла *a* является одним из широко используемых методов оценки биомассы фитопланктона в природных условиях. Для перехода от измеренной концентрации пигмента к биомассе водорослей

применяется отношение между органическим углеродом и хлорофиллом (С/Хл) [38, 61, 74, 164]. Однако величина С/Хл очень вариабельна и зависит от многих факторов: интенсивности света, температуры, обеспеченности водорослей минеральным питанием, таксономической структуры фитопланктона [60, 89, 97, 162, 172], что не позволяет вывести универсальный переходный коэффициент между концентрацией хлорофилла и биомассой фитопланктона. По оценкам разных авторов диапазон изменчивости отношения С/Хл в природных условиях составляет от 20 до 500 [62, 164, 172]. Поэтому выявление закономерностей изменения отношения С/Хл в клетках водорослей в зависимости от условий их роста является важной и актуальной задачей.

**Цель** работы заключалась в оценке совместного действия интенсивности света, температуры и обеспеченности азотом на изменение скорости роста и содержания хлорофилла в клетках диатомовых водорослей.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. Оценить совместное действие интенсивности света и температуры на скорость роста диатомовых водорослей в широком диапазоне изменения каждого из факторов.

2. Выявить основные закономерности изменения отношения С/Хл в клетках водорослей в зависимости от световых и температурных условий их роста.

3. Оценить совместное действие интенсивности света и обеспеченности азотом на скорость роста и содержание хлорофилла в клетках микроводорослей.

4. На основе полученных закономерностей разработать модель, позволяющую оперативно оценивать отношение органического углерода к хлорофиллу *a* фитопланктона Черного моря в зимне-весенний период.

**Научная новизна.** Получены новые данные о закономерностях изменения скорости роста и содержания хлорофилла в клетках водорослей в различных вариантах сочетания интенсивности света, температуры и степени обеспеченности азотом в широком диапазоне изменения каждого из факторов. Впервые проведена оценка совместного влияния исследуемых факторов на изменение внутриклеточного отношения углерода к хлорофиллу при

интенсивности света выше  $500 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Экспериментально доказано, что в условиях светового ингибирования эффект совместного действия исследуемых факторов превышает сумму влияния каждого из них: снижение температуры и степени обеспеченности азотом усиливает ингибирующее действие света на изменение скорости роста и отношения С/Хл в клетках водорослей. На примере *Phaeodactylum tricornutum* установлено, что после исчерпания азота в среде рост водорослей продолжается некоторое время за счет внутриклеточного запаса этого элемента, что обеспечивает увеличение биомассы водорослей по углероду примерно в 2 раза. Впервые изучена динамика светового ингибирования скорости роста и фотоокисления хлорофилла в клетках при действии света высокой интенсивности ( $430\text{-}1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ) и последующего адаптационного восстановления функциональной активности водорослей в этих условиях. Предложено уравнение, позволяющее оценивать отношение С/Хл черноморского фитопланктона в зимне-весенний период (с декабря по апрель).

#### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.**

Результаты исследований, представленные в диссертационной работе, вносят вклад в общее понимание физиологических процессов, протекающих в клетках микроводорослей, а также стратегии их адаптации к условиям существования. Выявленные закономерности изменения скорости роста и содержания хлорофилла в клетках водорослей при совместном действии основных абиотических факторов среды могут быть использованы при разработке моделей оценки биомассы и первичной продукции фитопланктона в различных районах Мирового океана. Кроме того, результаты могут быть полезны при интерпретации данных мониторинга природных вод и в биотехнологии массового культивирования микроводорослей. Предложенное уравнение, описывающее зависимость отношения углерода к хлорофиллу от световых и температурных условий роста водорослей, может быть использовано для оперативной оценки величины С/Хл фитопланктона Черного моря в зимне-весенний период.

При выполнении работы применяли следующие **методы исследования**: метод световой микроскопии, спектрофотометрический метод определения

концентрации хлорофилла *a* в культуре водорослей, определение органического углерода и азота в клетках водорослей методом газо-адсорбционного хроматографического анализа, фотометрический метод определения концентрации нитратов в морской воде и средах для культивирования водорослей, методы математического моделирования. Обработку результатов исследований осуществляли с применением классических статистических методов.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Снижение температуры и степени обеспеченности азотом усиливает ингибирующее действие света на изменение скорости роста и содержания хлорофилла в клетках водорослей, что выражается в сужении границ светового оптимума, повышении степени фотоингибирования роста и резком уменьшении содержания хлорофилла.
2. В условиях светового ингибирования снижение скорости роста водорослей происходит на фоне светозависимого увеличения отношения углерода к хлорофиллу *a* (C/Хл) в их клетках.
3. Совместное действие температуры и степени обеспеченности клеток азотом на изменение скорости роста и содержания хлорофилла у микроводорослей носит аддитивный характер.
4. Количественные закономерности изменения отношения C/Хл, установленные для модельных видов диатомовых водорослей в различных световых и температурных условиях роста, применимы для оценки вариабельности данного параметра у черноморского фитопланктона в зимне-весенний период.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов диссертационной работы обеспечивается тщательным планированием схемы проведения экспериментов и применением адекватных современных методов исследования. Научные результаты и выводы, сформулированные в работе, подкреплены убедительными фактическими данными. Анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы докладывались на всероссийских и международных научных конференциях: Международная конференция молодых ученых «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Березно, 9-13 августа 2011 г.); III Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биологии, экологии и химии», посвященная 25-летию биологического факультета ЗНУ (г. Запорожье, 29 марта - 1 апреля 2012 г.); II Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и устойчивое развитие» (г. Симферополь, 12-16 сентября 2012 г.); Международная конференция молодых ученых "Актуальные проблемы ботаники и экологии" (г. Щелкино, 18-22 июня 2013 г.); VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Понт Эвксинский – 2013», посвященная 50-летию образования ИнБЮМ НАН Украины (Севастополь, 1-4 октября 2013 г.); VIII Международная конференция молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (г. Харьков, 3-6 декабря 2013 г.); Международная научная конференция «Физиология и биотехнология кислородных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее» (г. Москва, 27-30 мая 2014 г.); III Международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и устойчивое развитие» (г. Симферополь, 15-19 сентября 2014 г.); Всероссийская молодежная гидробиологическая конференция «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (пос. Борок, Ярославская обл., 10-13 ноября 2016 г.).

**Личный вклад соискателя.** Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Автором проведен анализ имеющейся в литературе информации по проблематике представленной диссертационной работы, проведен основной комплекс экспериментальных работ, обобщение, анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы. Диссертантом подготовлена рукопись диссертации и статьи соответствующей тематики.

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, из которых: 5 статей в специализированных научных изданиях,

рекомендованных ВАК РФ и ВАК Украины (опубликованные до 2014 г.), 2 из которых входят в базы SCOPUS и Web of Science, 9 работ в сборниках материалов и тезисах международных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 разделов, выводов, списка литературы, включающего 186 источников (в том числе иностранных - 133). Работа иллюстрирована 8 таблицами и 28 рисунками.

**Благодарности.** Автор считает своим приятным долгом выразить глубокую благодарность и признательность научному руководителю доктору биологических наук, профессору, руководителю отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ Финенко З.З. за помощь в разработке теоретических основ диссертации, руководство и разработку стратегии исследований. Отдельную благодарность выражаю научному сотруднику отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ Акимову А.И. за неоценимую помощь в планировании, постановке и проведении экспериментальной части работы, а также интерпретации полученных результатов. Выражаю искреннюю признательность Кожемяка А.Б. за определение концентрации углерода и азота в пробах на CHN-анализаторе, Галатоновой О.А. и Солоницыной О.Р. за предоставленные культуры водорослей, а также всем сотрудникам отдела экологической физиологии водорослей за постоянное внимание к работе и ценные замечания.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Скорость роста как основной экологический показатель динамики численности фитопланктона

Морской фитопланктон создает порядка 50 % первичной продукции от общей продукции Земли. Микроводоросли являются базовым звеном водных экосистем, определяют их биологическую продуктивность и функционирование всех звеньев трофической цепи [87]. Одной из основополагающих функциональных характеристик фитопланктона, влияющих на пространственно-временную изменчивость его биомассы и продукции в морских и пресноводных экосистемах, является скорость роста.

Условия существования морского фитопланктона варьируют в широком диапазоне значений факторов среды, определяя изменчивость функциональных характеристик микроводорослей, в первую очередь скоростей их фотосинтеза и роста. Изучение ответной реакции водорослей на влияние факторов среды находится в фокусе интересов исследователей на протяжении последних 50 лет, так как выявление такого рода взаимосвязей является важным инструментом для моделирования и понимания динамики развития фитопланктона. Основными абиотическими факторами, влияющими на рост и физиологическое состояние водорослей, являются интенсивность света, температура и содержание биогенных элементов в среде [18, 74, 134, 153].

### 1.1.1 Роль интенсивности света в общей изменчивости скорости роста водорослей

В ряду абиотических факторов, влияющих на физиологическое состояние фитопланктона в море, скорость его фотосинтеза и роста, первостепенное значение имеет видимый свет. Световые условия существования водорослей в природных условиях очень переменчивы, что обусловлено суточными и сезонными изменениями в освещенности, а также изменчивостью условий освещения, вызванной вертикальным перемешиванием водных масс. К примеру, по данным спутниковых наблюдений среднесуточная величина фотосинтетически активной радиации (ФАР), падающей на поверхность Черного моря, варьирует от минимальных значений 6–12  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  в зимний период до 50–60  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  в летние месяцы (данные получены из <https://oceandata.sci.gsfc.nasa.gov>). В то же время величина средней освещенности в верхнем квазиоднородном слое, в пределах которого вегетирует фитопланктон в Черном море, по данным [71] изменяется от  $2,4\pm 0,8 \text{ Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  в декабре до  $27\pm 8,1 \text{ Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  в августе.

Свет разной интенсивности может оказывать лимитирующее, насыщающее или ингибирующее действие на рост и фотосинтез клеток. В море преобладающая доля фитопланктона вегетирует в условиях светового лимитирования [77, 104, 106], когда скорость роста клеток ( $\mu$ ) регулируется преимущественно интенсивностью света ( $I$ ) и между указанными параметрами наблюдается линейная зависимость. Универсальным параметром для описания начального восходящего участка  $\mu$ - $I$  зависимости (участок светового лимитирования) является тангенс угла наклона  $\alpha$ , характеризующий скорость увеличения ростовых показателей по мере увеличения интенсивности света - эффективность роста водорослей [29, 166]. В ряде работ было показано, что тангенс начального угла наклона световой зависимости скорости роста ( $\alpha$ ) сильно различается как у разных систематических групп водорослей [80, 85, 166], так и в пределах одной таксономической группы [163]. Согласно одному из последних обширных

литературных обзоров [80] эффективность роста разных представителей фитопланктона варьирует в пределах  $0,001-0,1 \text{ сут}^{-1} \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$ , у диатомовых водорослей преобладающая доля значений  $\alpha$  находится в диапазоне  $0,015-0,03 \text{ сут}^{-1} \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$ .

Межвидовая изменчивость значений угла  $\alpha$  в большей степени обусловлена различной способностью водорослей поглощать свет, которая представляет собой произведение внутриклеточного содержания хлорофилла и удельного (нормированного на хлорофилл *a*) показателя поглощения света. При этом следует отметить, что два последних показателя имеют противоположный знак светоадаптивного изменения [67], но содержание хлорофилла *a* в клетках изменяется в большей степени, чем удельное поглощение света, в результате снижение освещенности приводит к повышению эффективности роста водорослей. Высокие значения угла  $\alpha$  характерны для видов с низким отношением  $C/X_{\text{л} \min}$  (минимальное отношение  $C/X_{\text{л}}$  в клетках водорослей при низкой освещенности) [80, 85, 123]. Высокие величины эффективности роста наблюдаются у водорослей, адаптированных к низкому уровню освещенности [124], в то время как низкие величины этого параметра являются следствием адаптации к высокой освещенности, а также они наблюдаются у видов с миксотрофным типом питания [166].

Эффективность роста водорослей при низкой интенсивности света также зависит от объема клеток. Установлено, что тангенс угла наклона снижается с увеличением размера водорослей [80, 100, 166]. Показано, что  $\alpha$   $\mu$ -I зависимости у мелких ( $V \sim 1 \text{ мкм}^3$ ) и крупных ( $V \sim 10^7 \text{ мкм}^3$ ) клеток различается примерно в 8 раз [80]. Это объясняется так называемым «эффектом упаковки», который проявляется в снижении эффективности поглощения света фитопланктоном из-за «самозатенения» пигментов внутри крупных клеток [84, 90, 93].

Начало светового насыщения световой кривой скорости роста характеризует параметр  $I_k$  - значение интенсивности света, полученное при пересечении экстраполированного линейного участка кривой скорости роста с участком светонасыщенного роста.  $I_k$  - точка светового насыщения, выше

которой увеличение освещенности не приводит к повышению скорости роста. Для расчета величины  $I_k$  используют общепринятую формулу  $I_k = \mu_{\max}/\alpha$  [175]. Обобщив результаты наблюдений светозависимого роста у разных систематических групп водорослей, Ричардсон установил, что при сходных условиях роста  $I_k$  не сильно различается у видов одной таксономической группы. Так, насыщение скорости роста диатомовых водорослей отмечается в среднем при  $84 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а динофитовых – при  $47 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [158]. Для фитопланктона поверхностного слоя прибрежных вод Черного моря в летне-осенний период  $I_k$  составляет порядка  $40\text{--}50 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [31].

Величина  $I_k$  значительно изменяется в зависимости от температуры, при которой осуществляется культивирование клеток. Так, в экспериментах с культурами морских водорослей показано, что при снижении температуры с 20 до 10 °С  $I_k$  падает в 1,5-2,5 раза [72]. Аналогичные результаты приводятся и в более ранних работах [182, 185].

В оптимальных для роста световых условиях водоросли вегетируют с максимальной скоростью ( $\mu_{\max}$ ). Нижняя граница светового оптимума определяется, как было описано выше, величиной  $I_k$ . Верхняя граница соответствует интенсивности света  $I_t$ , выше которой наблюдается фотоингибирование роста клеток, сопровождающееся снижением скорости роста водорослей.

Величина  $\mu_{\max}$  сильно различается как между представителями разных систематических групп водорослей, так и в пределах одного таксона (таблица 1.1). Такая вариабельность значений, в большей степени, обусловлена различиями в размерах клеток - по мере увеличения объема клетки максимальная удельная скорость роста водорослей закономерно снижается [81, 100, 154]. В обзорной работе [163] для 67 видов диатомовых водорослей приводится диапазон изменения  $\mu_{\max}$   $0,2\text{--}3,3 \text{ сут}^{-1}$  со средним значением  $1,5\pm 0,8 \text{ сут}^{-1}$ , зависимость скорости роста от объема описывается при этом уравнением  $\mu_{\max}=3,4\cdot V^{-0,13}$ .

Таблица 1.1 – Межвидовые различия  $\mu_{\max}$  и  $It$  у разных систематических групп микроводорослей в оптимальных условиях роста

Параметр	Диатомовые водоросли	Динофитовые водоросли	Зеленые водоросли	Примечание
$\mu_{\max}$ , $\text{сут}^{-1}$	1,5±0,8 0,4–3,3; n=67	–	–	[163], морские виды
	1,47 0,76–1,94	0,52 0,47–0,77	1,45 1,27–1,59	[129], морские виды
	0,98 0,1–3,8; n=36	0,26 0,1–1; n=17	–	[80], морские виды, прибрежные районы
	0,5 0,1–2,8; n=19	0,35 0,2–0,8; n=5	–	[80], морские виды, открытая часть океана
	–	0,66 0,34–1,36; n=7	–	[33], морские виды
	0,45 0,15–1,3; n=16	0,25 n=1	0,88 0,48–1,68; n=17	[166], пресноводные виды
$It$ , $\text{мкЭ} \cdot$ $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$	175 50–800; n=33	170 80–800; n=15	–	[80], морские виды, прибрежные районы
	114 60–550; n=15	– 30–250; n=4	–	[80], морские виды, открытая часть океана
	75–250; n=5 >330; n=3	50–150; n=7 >75–300; n=2	–	[158], морские виды
	170 60–210; n=9	60 n=1	165 85–230; n=14	[166], пресноводные виды

Примечание: В ячейках таблицы указано среднее значение описываемого параметра, диапазон его изменения и число измерений (n), на основании которых произведен расчет

Однако, размер клеток – не единственный фактор, определяющий межвидовые различия в  $\mu_{\max}$ . Так, для мелкой диатомеи *P. tricornutum* в литературе приводится удельная скорость роста около  $1,7 \text{ сут}^{-1}$  [121], что значительно ниже  $\mu_{\max}$  у других представителей диатомовых водорослей примерно того же размерного ряда. Например, у *Thalassiosira pseudonana* максимальная скорость роста составляет порядка  $2,2\text{--}2,5 \text{ сут}^{-1}$  [136]. Вероятно, в данном случае низкая скорость роста *P. tricornutum* определяется не размером водорослей, а замедленной скоростью обменных процессов или особенностями диффузионного транспорта через клеточные мембраны из-за специфической формы клеток и структуры самих наружных мембран.

В обзорной работе [80] авторами показано, что максимальная скорость роста диатомовых водорослей выше у видов, выделенных из планктона прибрежных районов океана, чем из его открытой части. Средние значения  $\mu_{\max}$  составляют  $0,98$  и  $0,5 \text{ сут}^{-1}$  соответственно. В то же время для динофитовых водорослей такой зависимости исследователями выявлено не было. Среднее значение максимальной скорости роста для динофитовых видов, выделенных в прибрежных районах, составило  $0,26 \text{ сут}^{-1}$ , а для видов из открытой части океана –  $0,35 \text{ сут}^{-1}$ . В целом для динофлагеллят характерны более низкие значения скорости роста по сравнению с диатомовыми водорослями [176].

У пресноводных микроводорослей средние значения  $\mu_{\max}$  значительно ниже, чем у морских. Так, в работе [166] приведен диапазон изменчивости максимальной скорости роста у 16 видов пресноводных диатомовых водорослей от  $0,15$  до  $1,3 \text{ сут}^{-1}$ , со средним значением  $0,45 \text{ сут}^{-1}$ .

В таблице 1.1 представлены также некоторые усредненные диапазоны изменения  $I_t$  для диатомовых, динофитовых и зеленых микроводорослей. Показано, что водоросли проявляют разную степень устойчивости к свету высокой интенсивности – одни виды сохраняют высокий темп роста в широком диапазоне изменения освещенности, у других, наоборот, фотоингибирование скорости роста проявляется при довольно низких значениях  $I$ . Среди пресноводных представителей фитопланктона наиболее чувствительны к высокой

освещенности динофитовые и сине-зеленые водоросли ( $I_t \sim 50\text{--}110 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ), на втором месте диатомовые, зеленые и криптофитовые виды ( $I_t \sim 100\text{--}200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ), самыми устойчивыми к высокому свету являются десмидиевые водоросли ( $I_t \sim 200\text{--}250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ) [166]. Однако стоит отметить, что динофлагеляты в указанном обзоре представлены только одним видом. Для морских видов диапазон изменения значений  $I_t$  составляет примерно  $50\text{--}800 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [80, 158], что демонстрирует способность водорослей расти с максимальной скоростью при очень разных световых условиях.

В поверхностном слое моря при высокой облученности в летний период фитопланктон испытывают стресс фотоингибирования [84]. Vegetация микроводорослей при таких условиях может привести к угнетению скорости протекания физиологических процессов, деструкции фотосинтетических пигментов и гибели клеток [27]. Основной причиной ингибирования фотосинтеза и роста клеток при высокой интенсивности света является то, что при большой плотности светового потока скорость передачи энергии возбуждения от светособирающего комплекса к реакционным центрам превышает способность хлоропластов использовать ее в фотохимических реакциях, квантовый выход фотосинтеза снижается [26, 135]. Наиболее чувствительным звеном фотосинтетического аппарата к действию света высокой интенсивности является фотосистема II (ФС II), что связано с рядом особенностей ее структурно-функциональной организации, способствующих протеканию фотоокислительных процессов: ФС II отличается большим размером светособирающего комплекса, что обеспечивает мощный поток квантов света в реакционный центр, кроме того за счет процессов фотолиза воды в ФС II создается высокая локальная концентрация молекулярного кислорода [110]. Начальные процессы фотоингибирования протекают в реакционных центрах ФС II и вызваны нарушениями в работе электрон-транспортной цепи (как с донорной, так и с акцепторной стороны фотосистемы), приводящими к снижению скорости транспорта электронов через ФС II [147]. Фотоингибирование ФС II возникает вследствие появления в реакционном центре триплетных форм хлорофилла и

(или) активных окислителей (окисленных форм пигментов, синглетного кислорода, свободных радикалов). Повреждение белков реакционного центра и фотодеградация пигментов нарушают фотохимическую активность фотосистемы, инициируют процессы фотодеструкции белка D<sub>1</sub> [119]. Поврежденные избыточным освещением реакционные центры фотосистемы II постоянно репарируются за счёт синтеза белка D<sub>1</sub> [70].

Свет высокой интенсивности приводит к снижению эффективности утилизации (то есть квантового выхода фотосинтеза и роста) поглощенной пигментным аппаратом энергии, что сопровождается угнетением роста популяции. Водоросли способны адаптироваться к высокой освещенности, используя молекулярные механизмы функционирования фотосинтетического аппарата, а также защитные механизмы, препятствующие фотоингибированию и фотодеструкции пигментов. Основные среди них - уменьшение поглощения ФАР за счет снижения содержания пигментов в клетке, дезактивация активных форм кислорода, предотвращение поступления избыточной энергии света в реакционные центры за счет рассеивания ее в виде тепла с участием зеаксантина, увеличение роли фотопротекторных пигментов, повышение активности ферментных систем, репарация поврежденных комплексов ФС II, в частности восстановление белка D<sub>1</sub> [9, 30, 108].

В заключении отметим, что за последние несколько десятилетий исследователями накоплен обширный экспериментальный материал о закономерностях изменения скорости роста водорослей в зависимости от условий освещения. В том числе выделены и описаны основные параметры, характеризующие  $\mu$ -I зависимость в широком диапазоне изменения интенсивности света, включая участок светового ингибирования, показаны межвидовые различия указанных параметров. Однако преобладающая часть результатов о светозависимом изменении скорости роста получена при оптимальном уровне других ключевых факторов, таких как температура и степень обеспеченности минеральным питанием, без учета их возможного взаимодействия. В то же время в природных условиях на рост водорослей влияет

целый комплекс факторов среды, при этом нередко при изменении действия одного из них изменяется действие другого. Ввиду чего целесообразным является комплексное исследование совместного действия интенсивности света, температуры и обеспеченности клеток минеральным питанием на изменение ростовых показателей водорослей. Анализ уже имеющихся результатов в этом направлении представлен в следующих подразделах.

### 1.1.2 Влияние температуры на ростовые показатели водорослей

Температура регулирует скорость протекания ферментативных реакций в клетках, тем самым определяя интенсивность ключевых биологических процессов в организме, в том числе роста, фотосинтеза, и дыхания микроводорослей [75]. Многие представители фитопланктона способны существовать в широком диапазоне изменения температуры (эвритермные виды) и встречаются в планктоне разных географических широт и в разные сезоны года. Однако зона температурного оптимума, в пределах которого поддерживается максимальная скорость роста, для каждого вида обычно ограничена достаточно узким интервалом температуры. Поэтому температура может выступать одним из факторов, определяющих сезонную сукцессию видов в водоеме [3, 153].

Влияние температуры на рост и фотосинтез микроводорослей в условиях низкой освещенности имеет важное экологическое значение, так как в природных условиях фитопланктон большую часть времени находится в лимитированных по свету условиях. Вопрос о зависимости начального угла наклона  $\mu$ -I зависимости (эффективность роста,  $\alpha$ ) от температуры активно обсуждается в литературе уже на протяжении нескольких десятков лет, однако прийти к единому мнению исследователям так и не удалось. В ряде работ приводятся данные о независимости эффективности роста от температуры [58, 88]. Однако опубликованы и другие результаты, в которых зависимость  $\alpha$  от температуры

наблюдается [150, 182, 185]. Считается, что первичные фотохимические реакции фотосинтеза, которые определяют скорость роста водорослей на слабом свете, не зависят от температуры [75, 153]. Тем не менее, температурно-зависимое изменение угла наклона может быть связано с изменением величины спектрального удельного показателя поглощения света водорослями, которое в свою очередь зависит от содержания хлорофилла, вспомогательных пигментов и степени их упаковки в клетках [123].

При оптимальной освещенности интенсивность фотосинтеза и роста водорослей определяются скоростью ферментативных реакций, что приводит к появлению температурной зависимости этих процессов. В биологических исследованиях для описания температурной зависимости скорости ферментативных реакций используют физико-химические модели Аррениуса и Вант-Гоффа, на основании которых рассчитывают температурный коэффициент  $Q_{10}$ . В экспериментальном исследовании [1] авторами рассчитан коэффициент  $Q_{10}$  для 6 видов диатомовых и 7 видов динофитовых микроводорослей: диапазон изменения параметра составил от 2 до 3,5. При этом значения, полученные для диатомовых водорослей, были достоверно ниже, чем для динофлагеллят и составляли  $2,4 \pm 0,2$  и  $3,0 \pm 0,4$  соответственно. В целом считается, что при оптимальных световых условиях снижение температуры на  $10^\circ\text{C}$  приводит к снижению скорости роста водорослей примерно в 2 раза [82, 142, 153]. Однако необходимо отметить, что в случае, если температура оказывает деструктивное воздействие на фотосинтетический аппарат клеток (зона пессимума к действию температурного фактора) и приводит к снижению скорости их фотосинтеза и роста, значения  $Q_{10}$  значительно превышают 2. Так, например, в работе [182] у диатомовой водоросли *Leptocylindricus danicus* при понижении температуры от  $10$  до  $5^\circ\text{C}$  коэффициент  $Q_{10}$  достигал 6–8, автор объясняет высокие величины температурного коэффициента нарушением функциональной активности водорослей при  $5^\circ\text{C}$ .

Слабо изученным остается вопрос влияния температуры на скорость роста водорослей, растущих при высокой интенсивности света. С теоретической точки

зрения снижение температуры ниже оптимальных значений увеличивает чувствительность фотосинтетического аппарата клеток к действию света. Скорость образования органического вещества зависит от скорости, с которой в процессе световой реакции электроны «возбуждаются», переходят на другой энергетический уровень, и скорости, с которой эти электроны могут быть использованы в ферментативных темновых реакциях фотосинтеза [165]. Низкая температура приводит к торможению диффузионных процессов, а также уменьшению скорости ферментативных процессов, которые ограничивают скорость роста водорослей [134]. Симптомы низкотемпературного повреждения фотосинтетического аппарата клеток особенно выражены, когда происходят в условиях высокого освещения. Изменения функциональных характеристик водорослей, наблюдаемые как при низкой температуре, так и в условиях высокой интенсивности света похожи – снижение скорости передачи энергии от светособирающего комплекса к фотосистемам [137] и разрушение реакционных центров фотосистемы II (РЦ ФС II) [66, 119]. В работе [148] описано несколько гипотез, почему клетка становится чувствительнее к фотоингибированию при низкой температуре. Первая из них - восстановление РЦ ФС II замедляется при низкой температуре, так как снижается соотношение между синтезом (скорость синтеза температурнозависимый процесс) и разрушением белка D<sub>1</sub> (не зависит от температуры) [70]. Вторая – вегетация водорослей при низкой температуре приводит к снижению максимальной скорости фотосинтеза и тем самым увеличивает вероятность чрезмерного возбуждения ФС II при высокой освещенности [147]. Другой возможной причиной может быть то, что скорость процессов дезактивации активных форм кислорода, обеспечивающих защиту клетки от фотоингибирования, уменьшается при снижении температуры [159]. Кроме того при низкой температуре уменьшается скорость синтеза вспомогательного пигмента–фотопротектора зеаксантина, используемого клеткой для рассеивания избыточной энергии в виде тепла [110]. Тем не менее, несмотря на имеющиеся в литературе гипотезы, экспериментальных (количественных) доказательств того, что клетка становится чувствительнее к фотоингибированию

при снижении температуры, нам найти не удалось, и вопрос совместного действия низкой температуры и высокого света до настоящего момента остается открытым.

Главными вопросами нашей работы при исследовании совместного действия интенсивности света и температуры на скорость роста водорослей являются: 1) влияет ли температура на рост в лимитированных по свету условиях? 2) Как изменяется скорость роста в зависимости от температуры при оптимальной освещенности? 3) Как проявляется действие температуры в области светового ингибирования?

### 1.1.3 Скорость роста водорослей и обеспеченность клеток минеральным азотом

Помимо интенсивности света и температуры скорость роста водорослей зависит от обеспеченности клеток элементами минерального питания. Считается, что в большинстве районов Мирового океана первичная продукция ограничена недостатком неорганических соединений азота [77, 104]. Азот является основным структурным элементом клеток, входит в состав белков, аминокислот, нуклеиновых кислот, хлорофилла [84]. Дефицит азота приводит к снижению содержания хлорофилла в клетках [53, 59, 107], подавлению синтеза белка [96], снижению эффективности световых реакций фотосинтеза, уменьшению скорости фотосинтетической фиксации углерода и роста водорослей [4, 84, 102], а впоследствии и к гибели клеток. По мере возрастания степени азотного лимитирования у водорослей повышается чувствительность к фотоингибированию [118] и снижается способность к фотоакклимации [115].

В практике гидробиологических исследований для описания зависимости скорости роста водорослей ( $\mu$ ) от концентрации субстрата в среде (S), в частности азота, используется уравнение, предложенное Ж. Моно [141]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times S}{K_s + S} \quad (1.1)$$

где  $\mu_{\max}$  – максимальная возможная скорость роста, не ограниченная концентрацией субстрата;

$K_s$  – константа полунасыщения, равная концентрации субстрата, при которой скорость роста равна половине от максимально возможной.

Величина  $K_s$  характеризует сродство организма к субстрату и определяет его способность расти при низких концентрациях биогенного элемента в среде.  $K_s$  и  $\mu_{\max}$  являются своего рода индикаторами конкурентоспособности видов в определенных условиях обеспеченности клеток минеральным питанием [79]. Так, в условиях азотного лимитирования в фитопланктоне будут доминировать виды с низкими значениями  $K_s$  и  $\mu_{\max}$ , в то время как при обеспеченности водорослей биогенным элементом, наоборот, преобладать будут виды с высокими значениями  $\mu_{\max}$ . В исследованиях неоднократно показано, что величина константы полунасыщения (в частности для нитратного азота) ниже у фитопланктона олиготрофных районов океана (<0,1 мкМ), чем у водорослей из эвтрофных районов (~1 мкМ) [68, 111].

Для оценки степени лимитирования фитопланктона биогенными веществами в море используется подход, основанный на изучении зависимости скорости поглощения питательных веществ фитопланктоном от их концентрации в среде [111, 120]. Для описания этой зависимости используют уравнение Михаэлиса-Ментен, общий вид которого соответствует уравнению Моно. При условии, что внутриклеточное содержание исследуемого биогенного элемента постоянно, значения констант полунасыщения, рассчитанные по скорости роста и скорости поглощения, совпадают. Однако в том случае, когда скорость роста сильно лимитирована недостатком азота и внутриклеточное содержание этого элемента снижается до минимальных значений,  $K_s$  по поглощению может в 4-9 раз превышать таковую по скорости роста [144].

Как уже было отмечено выше, величина константы полунасыщения сильно различается между видами. Так, в работе [163] показано, что диапазон изменения величины  $K_s$ , рассчитанной по скорости поглощения нитратного азота, у диатомовых водорослей (в культурах) находится в пределах от 0,02 до 10,2 мкМ, со средним значением  $1,6 \pm 1,9$  мкМ (расчет проведен для 35 видов). Необходимо отметить, что максимальное значение  $K_s = 10,2$  мкМ, полученное для *Ethmodiscus* [183], было единственным в исследовании значением такого порядка. Величина константы полунасыщения для остальных видов диатомовых водорослей не превышала 3,1 мкМ. В работе [129] авторами приведены диапазоны изменения  $K_s$  (для азота в нитратной форме) для отдельных систематических групп водорослей. Так, для диатомовых видов этот диапазон составляет 0,93-1,58 мкМ со средним значением 1,25 мкМ. У динофлагеллят  $K_s$  значительно выше и изменяется в пределах 2,5-6,3 мкМ со средним значением около 5 мкМ. Безусловно, есть и исключения - для динофитовой водоросли *Gonyaulax polyedra* приводятся значения порядка 8,6–10,3 мкМ [83], а для *Gymnodinium breve* 1,4 - 16,2 мкМ [168]. Средние величины  $K_s$  для зеленых водорослей и кокколитофорид составляют 3,4 и 0,2 мкМ соответственно [129].

Использование уравнений Моно и Михаэлиса-Ментен затрудняется тем фактом, что до конца неясно, как изменяется величина  $K_s$  в световых и температурных условиях, отличающихся от оптимальных. Известно, что скорость поглощения азота сильно варьирует в зависимости от интенсивности света [128, 160] и температуры [132, 155]. Касательно световой и температурной зависимости величины  $K_s$  данных немного. Так, исследования Андерсона и Роелса [57] с диатомовой водорослью *Chaetoceros curvisetus* показали, что, несмотря на зависимость скорости поглощения азота от освещенности,  $K_s$  является независимым от света параметром. В работе [179] у *Gymnodinium splendens* при снижении температуры от 25 до 18 °C наблюдалось изменение  $K_s$  более чем в 5 раз – от 6,5 до 1 мкМ. Температурно-зависимое изменение  $K_s$  было отмечено также в работах [54, 167].

Основная же сложность применения описываемых уравнений заключается в том, что в основе использования зависимости Моно лежит положение о постоянстве соотношения элементов в клетке. В то же время известно, что в условиях азотного лимитирования внутриклеточное содержание этого элемента может снижаться до 5 раз [129, 170]. Уменьшение содержания биогенных элементов в клетке является важнейшей физиологической ответной реакцией водорослей на ухудшение условий минерального питания. Поэтому в качестве основного критерия степени обеспеченности водорослей азотом целесообразнее использовать содержание элемента в клетке (его клеточную квоту), так как скорость роста в большей степени определяется содержанием элемента в клетке, чем его концентрацией в среде.

Концепция клеточной квоты берет начало с работ Друпа [78], где зависимость скорости роста ( $\mu$ ) от содержания элемента в клетке ( $Q$ ) описывается уравнением:

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{1 - Q_{\min}/Q}{1 - Q_{\min}/Q_{\max}} \quad (1.2)$$

где  $\mu_{\max}$  – максимальная возможная скорость роста, не ограниченная концентрацией субстрата;

$Q_{\min}$  – минимальное содержание элемента в клетке;

$Q_{\max}$  – максимальное содержание элемента в клетке.

Для количественного выражения клеточной квоты азота используют соотношение между внутриклеточными концентрациями углерода и азота ( $C/N$ ). В условиях высокой обеспеченности водорослей азотом содержание элемента в клетке максимально, а величина соотношения  $C/N$  при этом имеет минимальное значение ( $C/N_{\min}$ ) и составляет порядка 6–8 [101, 129, 163]. В работе [163] авторами по результатам анализа литературных данных показано, что у 85 % описываемых ими видов диатомовых водорослей (примерно 40 видов) величина отношения  $C/N_{\min}$  находилась в пределах от 5 до 9,7 со средним значением

7,3±1,2. Минимальное значение  $C/N_{\min} = 2,7$  было зафиксировано у *Thalassiosira gravida* [112].

Максимальное значение отношения  $C/N$  в клетке, наблюдаемое в условиях азотного голодания, крайне видоспецифично, что отражает разную способность видов адаптироваться к меняющимся условиям минерального питания. В работе [129] на основе анализа литературных данных выведены средние значения минимальной клеточной квоты для отдельных таксономических групп водорослей, в пересчете на соотношение  $C/N$  получены следующие результаты: для диатомовых водорослей - 15 (диапазон изменения параметра между видами – от 14 до 50), для динофитовых – 22 (20–25), для зеленых – 34 и для кокколитофорид – 45.

Следует отметить, что описанные выше соотношения характерны для водорослей, вегетирующих в оптимальных световых и температурных условиях. Вопрос изменения внутриклеточной квоты азота за пределами этих оптимумов менее изучен, но имеющиеся данные показывают высокую вариабельность исследуемого параметра в зависимости от условий роста. Показано, что даже при высокой обеспеченности водорослей минеральным питанием снижение температуры выращивания от 20 до 11 °С приводило к линейному повышению внутриклеточной концентрации азота примерно в 4 раза у *Scenedesmus sp.* и 6 раз у *Asterionella formosa* [157]. Кроме того авторы показали, что комбинированный эффект действия субоптимальной температуры и недостатка азота превышает сумму их эффектов. К примеру, в условиях азотного лимитирования ( $qN = 0,96 \cdot 10^{-7}$  мкМ·кл.<sup>-1</sup>) и оптимальной температуре скорость роста *Scenedesmus sp.* была равна 0,75 сут<sup>-1</sup>. При полной обеспеченности водорослей азотом и субоптимальной температуре 16 °С  $\mu = 1,05$  сут<sup>-1</sup>. В то же время при  $qN = 0,96 \cdot 10^{-7}$  мкМ·кл.<sup>-1</sup> и температуре 16 °С скорость роста была равна нулю. Отсюда можно сделать вывод, что при низкой температуре клетке требуется больший ресурс азота для поддержания той же скорости роста, что и при оптимальной температуре. В работе [131] авторы отмечают независимость отношения  $C/N$  от температуры выращивания у *Chaetoceros sp.* и *Prorocentrum minimum*, в то время

как у двух других исследуемых ими видов - *Thalassiosira weissflogii* и *Gyrodinium uncatenum* - такая зависимость наблюдается. Увеличение интенсивности света в условиях азотного лимитирования приводит к снижению его удельного содержания в клетке и соответственно к увеличению отношения C/N [76, 173].

В целом, в настоящее время среди исследователей установилось мнение, что модель Моно адекватна при описании устойчивого роста водорослей в стационарных условиях, подобных хемостату. Для описания процесса роста при изменяющихся внешних условиях, например, при накопительном культивировании необходима более сложная модель, учитывающая зависимость скорости роста от внутриклеточной концентрации ресурса [46]. При проведении факторных экспериментов в качестве основного критерия оценки степени обеспеченности водорослей азотом наиболее целесообразно использовать внутриклеточное отношение углерода к азоту.

## **1.2 Содержание хлорофилла *a* в клетке как отражение условий роста водорослей**

Концентрация фотосинтетических пигментов в растительной клетке определяет ее способность поглощать световую энергию. Содержание хлорофилла *a* является важнейшей характеристикой продукционных возможностей клетки [84]. Характер изменения внутриклеточного содержания хлорофилла в зависимости от интенсивности света был известен уже в конце 19 века. В свою очередь вопрос количественного описания этой зависимости актуален по сегодняшний день, так как измерение концентрации хлорофилла *a* является одним из широко используемых методов оценки биомассы фитопланктона в природных условиях. Для перехода от измеренной концентрации пигмента к биомассе водорослей применяется отношение между органическим углеродом и хлорофиллом *a* (далее C/Хл, мг/мг) [38, 61, 74, 164].

Однако сложность такого перехода заключается в значительной вариабельности величины  $C/X_{л}$ , которая в природных условиях по оценкам разных авторов может изменяться в диапазоне от 20 до 500 [62, 164, 172]. Так, например, для прибрежных вод Черного моря характерно изменение  $C/X_{л}$  от минимальных значений порядка 50 в зимний сезон ( $I = 45-70 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $T = 7-10 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $N_{\text{NO}_3} = 5-8 \text{ мкМ}$ ) до 250-500 летом ( $I = 450-650 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $T = 20-28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $N_{\text{NO}_3} < 1 \text{ мкМ}$ ). В осенний и весенний сезоны наблюдаются промежуточные значения исследуемого параметра – 100-300 [172]. Для сравнения в Саргассовом море отношение  $C/X_{л}$  изменяется от 60 зимой ( $I = 115 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) до 230 летом ( $I = 580 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ,  $T = 26 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [105]. В Ла-Манше в аналогичных условиях отношение изменяется от 20 до 200 [130].

Вариабельность величины  $C/X_{л}$  в море определяется, прежде всего, условиями роста водорослей, к которым относятся интенсивность света, температура, степень обеспеченности элементами минерального питания [61, 74, 134], а также генотипическими различиями у разных таксономических групп водорослей, образующих фитопланктонное сообщество [89, 97]. В связи с этим для моделирования и понимания динамики развития фитопланктона необходимо установить закономерности изменения параметра  $C/X_{л}$  *a* при различном сочетании условий освещенности, температуры и обеспеченности азотом.

### 1.2.1 Влияние основных абиотических факторов на изменение отношения $C/X_{л}$ *a* у микроводорослей

Известно, что при снижении интенсивности света содержание хлорофилла в клетках любых фотосинтезирующих организмов повышается [25]. В свою очередь свет высокой интенсивности приводит к фотоокислению и деградации молекул хлорофилла, что сопровождается снижением способности клеток к поглощению квантов света. В то же время при высокой плотности светового потока в клетке

увеличивается синтез фотопротекторных пигментов. С одной стороны, они являются вспомогательными пигментами светособирающего комплекса, улавливающими солнечный свет определенного спектрального состава. С другой стороны, функция фотопротекторов заключается в защите клетки от фотоповреждений, они принимают на себя энергию от избыточного количества возбужденных молекул хлорофилла и безопасным для фотосинтетического аппарата способом рассеивают ее в виде тепловой энергии [30, 34].

При световом лимитировании величина  $C/X_{л}$ , как правило, линейно зависит от плотности светового потока. При увеличении интенсивности света (в области насыщающей рост освещенности) в ряде исследований сохраняется линейная (или близкая к ней) зависимость  $C/X_{л}$  от света до  $400 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и более [89, 97, 178], в других наблюдается выход световой кривой на плато при этих освещенностях [60, 103]. Показано, что для большинства видов повышение отношения  $C/X_{л}$  на 60 % относительно его минимального значения регистрируется при скорости роста водорослей равной примерно 50 % от ее максимальной величины [134]. Однако абсолютные значения внутриклеточной концентрации хлорофилла могут значительно различаться между таксонами, адаптированными к одинаковым условиям. Так, например, у диатомеи *Thalassiosira weissflogii* в световом диапазоне  $30\text{--}600 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  отношение  $C/X_{л}$  изменяется от 20 до 64, а у примнезиофитовой водоросли *Isochrysis galbana* в этом же диапазоне освещенности  $C/X_{л}$  повышается от 42 до 173 [85]. В работе [124] при повышении интенсивности света от 20 до  $400 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  величина  $C/X_{л}$  изменялась от 20 до 60 у диатомеи *Skeletonema costatum*, у динофитовой водоросли *Gonyaulax tamarensis* - от 57 до 172, а у *Olisthodiscus luteus* - от 33 до 62. Еще в ранних работах акцентировалось внимание на том, что содержание хлорофилла на единицу углерода у диатомовых водорослей гораздо выше, чем у динофитовых [42, 69, 97]. Анализ большого экспериментального материала (36 видов из 7 таксономических групп), проведенный Финенко с соавторами, показал, что отношение  $C/X_{л}$  в одинаковых условиях роста может различаться между таксонами до 4 раз, при этом

минимальные значения отношения характерны для зеленых водорослей, а максимальные – для динофитовых [89].

Не менее важным является вопрос о роли температуры в общей изменчивости содержания хлорофилла в клетках водорослей. Первые упоминания о повышении  $C/X_{л}$  со снижением температуры при одном уровне света были отмечены в работах [82, 127]. У *Dunaliella tertiolecta* при освещенности  $55 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  понижение температуры от 25 до 12 °С сопровождалось повышением отношения  $C/X_{л}$  более чем в 2 раза - от 16 до 38 [82]. В экспериментах с *P. tricornutum* величина  $C/X_{л}$  повышалась от 62 до 111 между 25 и 5 °С при интенсивности света  $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  [127]. В целом показано, что в условиях светового насыщения снижение температуры от 20–30 до 5–10 °С приводит к повышению отношения  $C/X_{л}$  в клетках водорослей примерно в 2–5 раз [61, 97, 174, 185].

Большинство данных, приводимых в литературе, о температурно-зависимом изменении величины  $C/X_{л}$  получены при оптимальных световых условиях. В то же время характер зависимости величины  $C/X_{л}$  от температуры при лимитирующей и ингибирующей рост водорослей интенсивности света до конца не ясен. В области низкой освещенности при параметрическом описании световой кривой отношения  $C/X_{л}$  используются такие показатели как минимальное значение отношения  $C/X_{л}$  ( $C/X_{л_{\min}}$ ) и начальный угол наклона световой зависимости  $C/X_{л}$  ( $\beta$ ). Оба параметра характеризуются значительной межвидовой изменчивостью. Так, в работе Гейдера показано, что величина  $\beta$  у разных видов водорослей варьирует в диапазоне от 0,04 до 1,9 ( $\text{мг } C/\text{мг } X_{л}) \cdot \text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , а  $C/X_{л_{\min}}$  – от 6 до 40 [97]. Как  $C/X_{л_{\min}}$ , так и  $\beta$  снижаются при повышении температуры, но для  $C/X_{л_{\min}}$  эта зависимость носит линейный характер, а для  $\beta$  – экспоненциальный [89, 97].

Спорным и довольно мало изученным остается вопрос о влиянии температуры на изменение  $C/X_{л}$  отношения при высокой освещенности. К примеру, в работе [74] авторами в основу модели положен тезис о том, что действие температуры на изменение отношения  $C/X_{л}$  в клетках водорослей

одинаково во всем световом диапазоне – экспоненциально снижается при повышении температуры. В то же время в другом исследовании показано, что действие температуры на изменение C/Хл снижается с уменьшением интенсивности света [89].

Температурная зависимость C/Хл отношения определяется физиологическими свойствами компонентов фотосинтетического аппарата. Уменьшение содержания хлорофилла в клетках водорослей по мере снижения температуры, вероятно, приводит к согласованию скоростей световых и темновых реакций фотосинтеза [35]; а также является адаптивной реакцией водорослей, способствующей повышению выживаемости клеток при неблагоприятных условиях роста, так как направлено на снижение окислительного стресса, вызванного образованием радикальных групп в фотосистемах и генерацией активных форм кислорода [26].

Содержание биогенных элементов в среде является одним из основных факторов, оказывающих влияние на содержание пигмента в клетках водорослей. Прежде всего, необходимо обеспечение клеток азотом [15, 53, 162] и магнием [47], так как оба эти элемента входят в состав молекулы хлорофилла. Скорость синтеза хлорофилла связана с синтезом белков, а, следовательно, с ассимиляцией азота [84]. Недостаток азота в среде приводит к значительному повышению C/Хл в клетках водорослей. Так, в экспериментах с *Thalassiosira pseudonana* и *T. weissflogii* при снижении концентрации азота в среде от 50 мкМ до аналитического нуля отмечено повышение величины C/Хл в среднем от 70 до 100–200 [73]. У *Dunaliella tertiolecta* отношение C/Хл повышалось от 25 в условиях обеспеченности клеток азотом до 100 при остром азотном лимитировании при прочих одинаковых условиях [98]. В экспериментах с диатомовой водорослью *Skeletonema costatum* показано, что при изменении условий минерального питания от полной обеспеченности азотом до острого голодания внутриклеточное отношение C/N меняется примерно в 3 раза - от 6 до 17, а отношение C/Хл более чем в 10 раз – от 25 до 333. При этом диапазон изменения C/Хл зависит от интенсивности света, при которой проводится

культивирование водорослей в эксперименте. Так, при освещенности ниже  $100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  ( $I = 7\text{--}100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ )  $C/Xл$  повышается примерно от 25 до 120, в то время как при интенсивности света выше  $100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  ( $100\text{--}1200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ )  $C/Xл$  изменяется от 38 до 333 [162]. В то же время в работе [89] показано, что у всех таксономических групп водорослей при недостатке азота в среде отношение  $C/Xл$  увеличивается одинаковым образом при разной интенсивности света.

Помимо азота для обеспечения синтеза хлорофилла необходимо достаточное количество фосфора [10], железа [102], молибдена [184], цинка [8] и ряда других элементов. Железо, например, является необходимым катализатором образования хлорофилла. Медь способствует образованию устойчивых комплексов между хлорофиллом и соответствующими белками, предотвращая разрушение хлорофилла [19].

### 1.2.2 Основные подходы к моделированию содержания хлорофилла *a* в клетках водорослей в зависимости от условий роста

Наиболее разработанным к настоящему времени является класс моделей, описывающих изменение содержания хлорофилла в клетках водорослей в зависимости от интенсивности света. Чаще всего для количественного отражения содержания хлорофилла у микроводорослей используют либо внутриклеточное отношение между углеродом и хлорофиллом *a* ( $C/Xл$ ), либо удельное содержание хлорофилла на единицу углерода ( $Xл/C$ ). Световая зависимость отношения  $C/Xл$  в ряде исследований описывается линейной функцией во всем диапазоне освещенности [89, 97], либо линейна на начальном участке световой кривой, а при расширении светового диапазона выходит на плато [60, 103]. В свою очередь зависимость отношения  $Xл/C$  от интенсивности света имеет классический экспоненциальный вид [74, 91, 145, 186].

В одном из последних исследований [36] для описания светозависимого содержания хлорофилла в биомассе микроводорослей предложена модель, основанная на представлении о биомассе как сумме резервных и структурных макромолекулярных форм органического вещества клеток. Хлорофилл авторы относят к структурным формам биомассы, и его содержание на единицу биомассы ( $Xл/C$ ) выражают в виде:

$$Xл/C = \frac{Xл/C_{max}}{1+a+\sqrt{a^2+b \cdot I_0/I_{sat}}}, \quad (1.3)$$

где  $Xл/C_{max}$  – максимальное значение отношения  $Xл/C$  при низкой интенсивности света;

$a$  и  $b$  – видоспецифические коэффициенты;

$I$  и  $I_{sat}$  – действующая и насыщающая интенсивность света.

Моделей, отражающих совместное действие нескольких факторов среды на изменение содержания хлорофилла, не много. Гейдером в 1987 году была предложена математическая зависимость отношения  $C/Xл$  от интенсивности света ( $I$ ) и температуры ( $T$ ) [97], в основу которой положены результаты, полученные на 13 видах водорослей из 3 таксономических групп:

$$C/Xл = (C/Xл_{min} - b \cdot T) + \beta \cdot I \cdot \exp(-k \cdot T), \quad (1.4)$$

где  $C/Xл_{min}$  – минимальное значение отношения  $C/Xл$  при  $I = 0$  и  $T = 0$  ( $C/Xл_{min} = 43,4$ );

$\beta$  - угол наклона зависимости  $C/Xл-I$  ( $\beta = 1,85$ );

$b$  и  $k$  – углы наклона температурной зависимости  $C/Xл_{min}$  и  $\beta$  соответственно ( $b = 1,14$  и  $k = 0,126$ ).

Согласно представленной модели при постоянной температуре отношение  $C/Xл$  линейно возрастает по мере увеличения плотности светового потока. Это положение базируется на понятии потока углерода между тремя

внутриклеточными пулами: 1) светособирающим аппаратом, включающим в себя пигмент-белковые комплексы, локализованные в фотосинтетических мембранах, реакционные центры и электрон-транспортную сеть (пул L); 2) биосинтетическим аппаратом, отвечающим за механизмы биосинтеза и репликации клеток (пул E) и 3) резервным энергетическим пулом, представленным полисахаридами и липидами (пул R). Схематично суть модели заключается в том, что при адаптации клетки к свету высокой интенсивности наблюдается уменьшение размера светособирающего аппарата, в том числе снижается и содержание хлорофилла, а резервный энергетический запас клетки при этом сильно увеличивается. При теневой адаптации, наоборот, наблюдается значительное увеличение пула L, в то время как пул R уменьшается до минимальных размеров. Снижение температуры (при постоянной интенсивности света) приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации хлорофилла, угол наклона  $C/X_{л-I}$  зависимости экспоненциально возрастает со снижением температуры. Температурно-зависимое изменение содержания хлорофилла в клетке интерпретируется авторами как адаптивная реакция, основанная на распределении клеточных ресурсов между не зависящими от температуры биофизическими реакциями (отвечают за сбор фотонов света) и температурно-зависимыми биохимическими реакциями. Этот механизм также снижает вероятность фотоингибируемого повреждения при высокой интенсивности света, которое может усугубляться при низкой температуре.

Динамическая модель фотоадаптации фитопланктона, предложенная Гейдером с соавторами в 1997 году [99], также была разработана на основе материального и энергетического баланса в клетке и корреляционных связей между отношением  $C/X_{л}$ , скоростью роста, фотосинтеза и дыхания. Влияние интенсивности света ( $I$ ) на изменение величины  $C/X_{л}$  выражено уравнением с тремя переменными:

$$C/X_{л} = C/X_{л_{\min}} / 1 + (C/X_{л_{\min}} \cdot \alpha_{X_{л}} \cdot I/2 \cdot P_m), \quad (1.5)$$

где  $C/X_{L_{\min}}$  – минимальное значение отношения  $C/X_L$  при низкой интенсивности света;

$\alpha_{X_L}$  – начальный угол наклона световой кривой скорости фотосинтеза, нормированный на хлорофилл;

$P_m$  – максимальная скорость фотосинтеза.

Уравнение (1.5) основано на положении, что эффективность фотосинтеза и максимальная скорость фотосинтеза не зависят от интенсивности света, а скорость синтеза хлорофилла пропорциональна максимальной скорости фотосинтеза. Влияние температуры и недостатка питательных веществ включаются в модель через ограничения, которые они накладывают на величину максимальной скорости фотосинтеза.

Позже работа Гейдера была развита Финенко с соавторами [89], исследователи на основании анализа большого экспериментального материала (36 видов водорослей из 7 таксономических групп) вывели уравнение, описывающее зависимость отношения  $C/X_L$  от интенсивности света ( $I$ ), температуры ( $T$ ) и обеспеченности клеток азотом:

$$C/X_L = (C/X_{L_{\min}} - T) + I \cdot 63,3 \cdot \exp(-0,163 \cdot T) / (0,1 + 0,9 \cdot \mu/\mu_{\max}), \quad (1.6)$$

где  $C/X_{L_{\min}}$  – отношение  $C/X_L$  при  $I = 0$  и  $T = 0$ , равное  $41,3 \pm 3,9$  у диатомовых водорослей и *Prochlorococcus*,  $74,7 \pm 2,3$  - у динофитовых водорослей,  $54,3 \pm 2,9$  - у сине-зеленых и примнезиофитовых водорослей;

$\mu/\mu_{\max}$  – относительная скорость роста, отражающая степень азотного лимитирования.

Согласно предложенной модели (1.6) при постоянной температуре отношение  $C/X_L$  повышается линейно с увеличением света и уменьшается экспоненциально с ростом температуры при одинаковой интенсивности света, действие температуры на изменение  $C/X_L$  отношения при этом снижается с уменьшением освещенности. При недостатке азота в среде  $C/X_L$  увеличивается одинаково при разной интенсивности света. В целом предложенная зависимость

позволяет достаточно точно описать изменение отношения  $C/X_{л}$  у фитопланктона, но не применима при высоких значениях интенсивности света, где проявляется ингибирующее действие светового фактора на ростовые и структурные характеристики водорослей.

Клоерном с соавторами была предложена эмпирическая модель для описания комбинированного эффекта интенсивности света ( $I$ ), температуры ( $T$ ) и питательных веществ на отношение  $X_{л}/C$  без учета таксономических различий величины отношения (расчет произведен на основании 219 измерений отношения  $X_{л}/C$  у 14 видов микроводорослей) [74]:

$$X_{л}/C = 0,003 + 0,0154 \cdot \exp(0,05 \cdot T) \cdot \exp(-0,059 \cdot I) \cdot \mu', \quad (1.7)$$

где 0,003 – минимально возможное значение отношения  $X_{л}/C$ , принятое по литературным данным;

$\mu'$  - относительная скорость роста, лимитированная азотом ( $\mu/\mu_{\max}$ ),  $\mu_{\max}$  – скорость роста в условиях обеспеченности клеток минеральным питанием при освещенности  $I$  и температуре  $T$ .

Представленная зависимость базируется на следующих основных положениях: 1) нижний предел изменения отношения  $X_{л}/C$  составляет 0,003 г/г ( $C/X_{л} = 333$ ); 2) при постоянной интенсивности света и температуре наблюдается положительная линейная корреляционная связь между отношением  $X_{л}/C$  и относительной скоростью роста  $\mu'$  ( $\mu'$  отражает степень обеспеченности водорослей минеральным питанием), при этом угол наклона этой зависимости нелинейно снижается по мере уменьшения освещенности; 3)  $X_{л}/C$  экспоненциально возрастает при повышении температуры. Авторы отмечают, что предложенная модель не является окончательным решением сложной проблемы по оценке влияния факторов среды на величину отношения  $C/X_{л}$ , так как не учитывает ряд важных моментов, таких как изменчивость параметров  $\mu$ - $I$  и  $C/X_{л}$ - $I$  зависимостей при различном сочетании  $I$ ,  $T$  и обеспеченности минеральным питанием, динамику фотоадаптации, потери на дыхание, таксономические

различия видов. В то же время представленная модель позволяет описать большую часть изменчивости отношения  $Xл/C$  у водорослей, выращиваемых в лабораторных условиях в устойчивом состоянии.

В работе [61] представлена эмпирическая модель оценки первичной продукции океана по спутниковым данным. Одной из базисных составляющих представленной модели является оценка зависимости величины  $Xл/C$  от действия факторов среды, основанная на данных дистанционного зондирования концентрации хлорофилла и коэффициента обратного рассеяния, используемого для расчета углеродной биомассы фитопланктона. Зависимость имеет вид:

$$Xл/C = Xл/C_{\min} + (Xл/C_{\max} - Xл/C_{\min}) \cdot \exp^{-3I}, \quad (1.8)$$

Согласно представленной модели (1.8) отношение  $Xл/C$  экспоненциально снижается с ростом интенсивности света ( $I$ ). При этом кривая имеет максимум ( $Xл/C_{\max}$ ) при низкой освещенности, который экспоненциально повышается при увеличении температуры, и светонасыщенный минимум ( $Xл/C_{\min}$ ), который в свою очередь линейно снижается по мере увеличения степени биогенного лимитирования. По результатам анализа авторами приведены значения параметров уравнения (1.8) для 28 районов Мирового океана.

Таким образом, представленный выше обзор литературы демонстрирует, что вопрос влияния факторов среды, в частности интенсивности света, температуры, обеспеченности минеральным питанием, на скорость роста и содержание хлорофилла в клетках водорослей не нов. К настоящему моменту накоплен обширный экспериментальный материал по этой тематике, но большинство исследований было направлено на изучение действия одного из факторов при оптимальном уровне других. Данные о комплексном влиянии интенсивности света, температуры и биогенной обеспеченности на внутриклеточное отношение  $C/Xл$  малочисленны и довольно противоречивы. В частности, слабо изученным остается вопрос о влиянии температуры и степени обеспеченности азотом на скорость роста и содержание хлорофилла в клетках

водорослей в условиях светового лимитирования, и практически нет данных о действии описываемых факторов на физиологическое состояние водорослей при ингибирующей их рост интенсивности света. Не ясно будут ли исследуемые факторы (при их совместном влиянии) усиливать действие друг друга или же эффект их совместного действия будет равен сумме влияния каждого из факторов. Ввиду этого проведение комплексного экспериментального исследования по оценке совместного действия интенсивности света, температуры и степени обеспеченности водорослей азотом в широком диапазоне изменения каждого из факторов является важной и актуальной задачей и позволит получить новые знания о закономерностях изменения структурно-функциональных показателей водорослей в различных условиях их роста.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Систематическое положение исследуемых объектов

В качестве объекта исследования были выбраны альгологически чистые культуры морских диатомовых водорослей – *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897), *Nitzschia sp. № 3* (Прошкина-Лавренко, 1955) и *Skeletonema costatum* (Cleve, 1873) – из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ РАН. Выбор видов обусловлен тем, что первые два из них обладают высокой жизнестойкостью при культивировании и часто используются в гидробиологических исследованиях в качестве модельных объектов, а *Skeletonema costatum* является одним из широко распространенных представителей фитопланктона Черного моря.

*Phaeodactylum tricornutum* - морской, солоноватоводный, эвригалинный вид, очень широко распространенный в морских и континентальных водоемах. Вид планктонный, встречается круглогодично, но преимущественно весной и осенью. Клетки одиночные, двух видов: клетки слегка серповидно изогнутые и клетки трехлучевые (рисунок 2.1А). Таксономический статус *Phaeodactylum tricornutum* отражает следующая схема: отдел Bacillariophyta, класс Bacillariophyceae, порядок Naviculales, семейство Phaeodactylaceae, род Phaeodactylum, вид *Phaeodactylum tricornutum* [24].

*Nitzschia sp. № 3* - вид распространен в Черном море у берегов Карадага и в Севастопольской бухте. Клетки одиночные, с пояса и со створки линейные. Отличается от известных видов рода *Nitzschia* мелкими размерами (длина 17–20 мкм, ширина 2–2,5 мкм) и веретенообразной формой с широкозакругленными краями (рисунок 2.1Б). Структура створок невидимая. Два пластинчатых хроматофора расположены по бокам центрального ядра. Таксономический статус *Nitzschia sp. № 3* отражает следующая схема: отдел Bacillariophyta, класс

Bacillariophyceae, порядок Bacillariales, семейство Bacillariaceae, род *Nitzschia*, вид *Nitzschia* sp. № 3 [24].

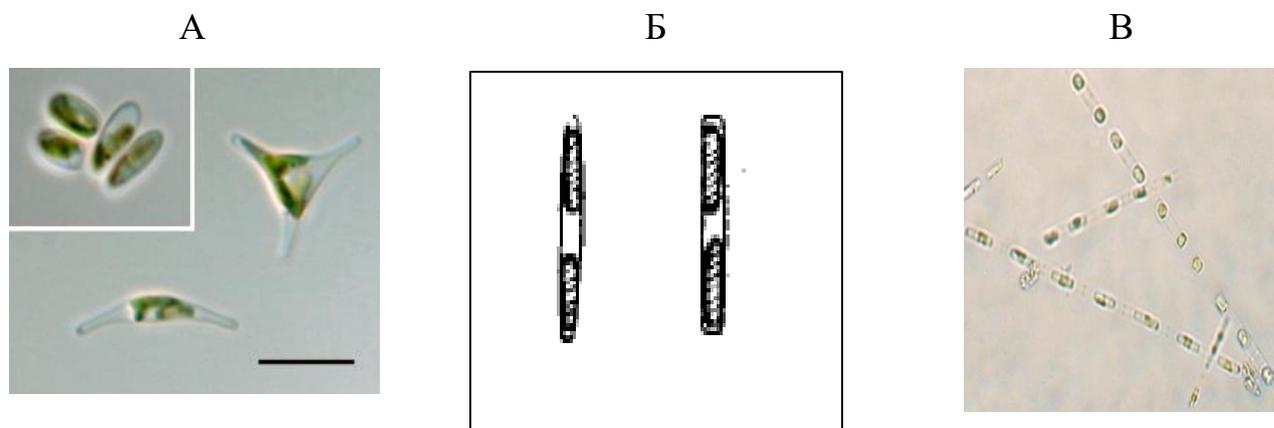


Рисунок 2.1 - Внешний вид исследуемых видов водорослей: А - *Phaeodactylum tricornutum* (фото: Ansgar Gruber, Universitat Konstanz), Б - *Nitzschia* sp. № 3 (фото: [24]), В – *Skeletonema costatum* (фото: <https://commons.wikimedia.org>)

*Skeletonema costatum* - пелагический, эвритермный и эвригалинный, широко распространенный вид (космополит). Встречается в Черном море у всех берегов, особенно в бухтах. Летом отсутствует, появляется осенью, вегетирует до конца апреля, в марте – апреле развивается в массе до 4 млн. клеток в 1 м<sup>3</sup>, вызывает цветение, в конце мая исчезает. Клетки от линзовидных до цилиндрических, высота 10–27,5 мкм. Створки выпуклые, диаметр 1,8–12,3 мкм, по краю диска кольцо тонких, прямых, вертикально направленных щетинок (от 4 до 20), с помощью которых клетки соединяются в прямые цепочки (рисунок 2.1В). Таксономический статус *Skeletonema costatum* отражает следующая схема: отдел Bacillariophyta, класс Coscinodiscophyceae, порядок Thalassiosirales, семейство Skeletonemaceae, род *Skeletonema*, вид *Skeletonema costatum* [24].

## 2.2 Условия проведения экспериментов

Экспериментальная работа была выполнена на базе отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ и включала в себя пять серий опытов (далее эксперименты № 1, 2, 3, 4, 5). Результаты, полученные в экспериментах № 1, 2, 3 и 5, соответствуют фазе экспоненциального роста водорослей. В эксперименте № 4 исследовали изменение скорости роста и структурных характеристик водорослей в процессе их накопительного роста, включая лаг-фазу, участки экспоненциального и стационарного роста культуры. Во всех экспериментах в период предварительной адаптации водорослей к исследуемым световым и температурным условиям, а также различным условиям минерального питания плотность культур поддерживали на одном уровне в экспоненциальной фазе роста путем разбавления свежей питательной средой один раз в сутки до концентрации углерода в пробах  $1-1,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ .

*Эксперимент № 1. Исследование изменения скорости роста и отношения C/Хл а у P. tricornutum, Nitzschia sp. № 3 и S. costatum в различных световых и температурных условиях.* Исследование изменения структурно-функциональных показателей водорослей проводили в 40 различных вариантах сочетания интенсивности света и температуры для каждого из изучаемых видов. *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* культивировали при интенсивности света – 4, 14, 25, 42, 85, 225, 430, 600, 900 и  $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  – и температуре: 5, 10, 20 и  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для *S. costatum* был выбран более узкий диапазон освещенности - 5, 16, 24, 35, 100, 115, 170, 240, 350 и  $530 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , что связано с низкой толерантностью вида к действию света высокой интенсивности, и четыре температуры: 5, 10, 15,  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Культивирование *S. costatum* при температуре  $23-25 \text{ }^\circ\text{C}$  приводило к гибели водорослей. Приведенные в работе результаты представляют собой средние значения четырех аналитических повторностей для каждого варианта опыта.

Водоросли в экспериментах культивировали на питательной среде F/2 [56]. Основой для приготовления среды служила морская вода из открытой части

Чёрного моря. Очистка воды от взвеси осуществлялась путем мягкой фильтрации через нуклеопоровый фильтр с диаметром пор 1 мкм или стекловолоконный фильтр GF/F с последующей пастеризацией на водяной бане при 70–80 °С. Пастеризацию воды проводили три раза с суточным интервалом [43].

Для создания необходимых условий освещения использовали световую решетку, представляющую собой закрытую конструкцию с отдельными ячейками для склянок (по две для каждой интенсивности света) и независимым источником освещения (светодиод) для каждой из них. Освещение инкубационных склянок осуществлялось снизу. Различную освещённость создавали с помощью сетчатых фильтров, помещаемых между светодиодом и склянкой. Уровень освещённости определяли внутри склянок зондирующим 4П датчиком квантометра QSL 2101. Для создания необходимых температурных условий использовали термостатированный бокс с регулируемой температурой.

До начала эксперимента в течение трех суток каждую из культур водорослей предварительно адаптировали к исследуемой температуре при непрерывном освещении интенсивностью  $35 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , для создания которого использовали люминесцентные лампы белого света Oreol White/15 W. Затем водоросли переносили в склянки объемом 25 мл (в двух повторностях для каждой освещённости) и помещали на световую решетку на 10 различных интенсивностей света. Адаптацию водорослей к каждой освещённости проводили в течение еще трех суток. За указанный временной промежуток водоросли осуществляли как минимум два клеточных деления, после чего считались адаптированными к новым условиям освещения [5].

После периода адаптации водоросли разбавляли свежей питательной средой до низкой плотности (концентрация углерода варьировала от 1 до  $1,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) и выращивали в накопительном режиме. Через сутки измеряли содержание углерода и хлорофилла *a* в каждой пробе. По изменению содержания углерода рассчитывали удельную скорость роста водорослей. Подробное описание методов определения содержания углерода и хлорофилла *a* в пробах, а также расчет

удельной скорости роста водорослей приведены в подразделе 2.3 «Методы измерений».

*Эксперимент № 2. Исследование изменения скорости роста и отношения C/Хл а у P. tricornutum в условиях экстремально низкой освещенности.* Исследование проводили при интенсивности света – 1,5; 3; 6; 10; 15 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> – и двух температурах – 10 и 20 °С. В ходе эксперимента водоросли выращивали в культивационных сосудах прямоугольной формы объемом 100 мл, три боковые стенки которых были покрыты черной краской, что препятствовало проникновению света из других источников.

Культивирование водорослей при 10 и 20 °С осуществлялось одновременно. Для этого экспериментальные сосуды помещали с двух сторон от источника света – в термостатированный бокс с температурой 10 °С с одной стороны и при комнатной температуре 20 °С - с другой. В качестве источника света использовали вертикальную световую решётку, состоящую из люминесцентных ламп белого света Oreol White/15 W. Различную освещённость создавали с помощью сетчатых фильтров, помещаемых между экспериментальным сосудом и источником света.

В течение первых пяти суток эксперимента водоросли адаптировали к исследуемым световым и температурным условиям. После периода адаптации на шестые сутки измеряли содержание углерода и хлорофилла *a* в пробах, рассчитывали удельную скорость роста клеток (см. подраздел 2.3 «Методы измерений»).

*Эксперимент № 3. Исследование динамики удельной скорости роста и отношения C/Хл а у P. tricornutum при переносе на свет различной интенсивности.* Исходную культуру *P. tricornutum* в течение 14 суток до начала эксперимента адаптировали к двум интенсивностям света - 17 и 225 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. После этого обе культуры переносили на световую решетку, устройство которой было описано выше в эксперименте № 1, на семь интенсивностей света: 16, 25, 50, 110, 430, 900 и 1250 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. В ходе опыта водоросли выращивали при непрерывном освещении при данных интенсивностях света и температуре 15 °С в

течение 9 суток. Культуры поддерживали в экспоненциальной фазе роста путем разбавления питательной средой один раз в сутки. Измерение концентрации углерода и хлорофилла в пробах, а также удельной скорости роста проводили ежедневно в течение всего эксперимента.

*Эксперимент № 4. Исследование изменения структурно-функциональных показателей у *P. tricornutum* в зависимости от содержания азота в среде и внутри клеток в процессе накопительного роста культуры.* В ходе эксперимента водоросли выращивали в накопительном режиме в течение 20 суток на питательной среде, содержащей 414 мкМ  $\text{NaNO}_3$  и 59 мкМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , атомарное отношение  $\text{N:P} = 7:1$ , концентрация остальных компонентов соответствовала прописи среды F/2 [56]. Согласно отношению Редфилда оптимальное для роста фитопланктона соотношение  $\text{N:P}$  составляет 16:1 [156], а при  $\text{N:P} \leq 7$  остановка роста водорослей в накопительной культуре произойдет из-за дефицита азота [101].

В ходе эксперимента водоросли выращивали при двух температурах – 10 и 20 °С. При 10 °С культивирование проводили в термостатированном боксе с регулируемой температурой при освещенности – 9, 17, 43, 86, 172  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , при 20 °С изменение ростовых и структурных характеристик *P. tricornutum* исследовали при интенсивности света – 17, 43 и 172  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . До начала эксперимента в течение трех суток водоросли предварительно адаптировали к исследуемым световым и температурным условиям. Исходная плотность культуры во всех вариантах эксперимента составляла 0,3–0,5  $\text{мг С} \cdot \text{л}^{-1}$ .

В качестве источника света в эксперименте использовали люминесцентные лампы белого света Oreol White/15 W. Интенсивность освещения регулировали путём изменения расстояния между источником света и экспериментальными склянками. Для измерения интенсивности света использовали люксметр Ю-116. Для перевода освещённости в энергетические единицы принимали, что 1 клк = 17,2  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  [22]. Слой суспензии водорослей в экспериментальных сосудах не превышал 1 см, что позволило избежать изменения световых условий в ходе эксперимента из-за уплотнения культуры и самозатенения клеток.

При накопительном росте водорослей в условиях снижения концентрации азота в среде изучали изменение внутриклеточного содержания азота, для количественного отражения которого использовали атомарное отношение углерода к азоту (C/N). При анализе полученных результатов основывались на том, что максимальное отношение C/N соответствует минимальному содержанию азота в клетке и, наоборот, минимальное C/N наблюдается у клеток с максимальным внутриклеточным запасом азота. Параллельно в эксперименте определяли удельную скорость роста водорослей, внутриклеточные концентрации углерода и хлорофилла *a*, а также остаточную концентрацию азота в питательной среде. Подробное описание используемых методов приведено в подразделе 2.3 «Методы измерений».

*Эксперимент № 5. Исследование изменения световых кривых скорости роста и отношения C/Хл *a* у *P. tricornutum* в зависимости от исходной концентрации азота в среде.* Исходное содержание азота в питательной среде в разных вариантах эксперимента составляло – 414, 167, 83, 46, 23, 14 и 10 мкМ. Различную концентрацию азота создавали путем количественного разбавления исходной среды, состав которой описан в эксперименте № 4. Примененный в эксперименте метод количественного разбавления, на наш взгляд, является методически целесообразным, так как позволяет избежать изменения соотношения между азотом, фосфором и другими элементами среды, что само по себе может явиться дополнительным фактором, влияющим на изменение ростовых и структурных характеристик водорослей [16, 94].

Первые 7 суток эксперимента водоросли выращивали в полунепрерывном режиме на среде с исследуемым содержанием азота. Разбавление культур свежей питательной средой проводили один раз в сутки до концентрации углерода в пробах 1–1,2 мг·л<sup>-1</sup>. Водоросли экспонировали при непрерывном освещении интенсивностью 35 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> люминесцентными лампами белого света Oreol White/15 W. Температуру поддерживали на уровне 20±1 °С.

После периода адаптации водорослей к заданным условиям минерального питания на 8-е сутки эксперимента культуру переносили в склянки объемом 25 мл

(в двух повторностях для каждой освещённости) и помещали на световую решетку на 9 интенсивностей света - 14, 25, 42, 85, 225, 430, 600, 900 и 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Адаптацию водорослей к световым условиям проводили в течение еще трех суток (процедура та же, что и при адаптации к условиям минерального питания), после чего измеряли содержание углерода и хлорофилла *a* в пробах, рассчитывали удельную скорость роста водорослей (см. подраздел 2.3 «Методы измерений»). Эксперимент последовательно повторяли для каждой из исследуемых концентраций азота.

### 2.3 Методы измерений

*Определение содержания органического углерода и азота в клетках водорослей.* Содержание органического углерода и азота в клетках определяли методом газо-адсорбционного хроматографического анализа на газоанализаторе CHN-1. Для этого, фиксированное количество суспензии водорослей фильтровали (при разрежении не более 0,2 атм.) через стекловолокнистые фильтры Whatman GF/C диаметром 15 мм, предварительно прокаленные при 300 °С в течение 24 часов. После фильтрации полученные фильтры с навеской водорослей просушивали и сжигали в CHN-1 анализаторе [138]. В том случае, когда сжигание проводилось через некоторое время после фильтрации, собранные на фильтрах пробы водорослей просушивали и хранили до сжигания в эксикаторе в присутствии обезвоженного хлористого кальция.

Для анализа использовались газ носитель гелий, насадочная колонка с неподвижной фазой Porapak-Q и стандартный образец р-нитроанилин. Содержание N и C в стандартном образце составляло 20,27 % и 52,12 % соответственно. Содержание азота и углерода в навеске рассчитывали по разнице их содержания в высушенных фильтрах с навеской и в контрольных фильтрах по

калибровочным кривым, полученным при сжигании навесок стандартного образца.

Расчет соотношения между углеродом и азотом (C/N) в клетках водорослей проводили с учетом их молярных масс по уравнению:

$$C/N = (C_i / N_i) \cdot (14 / 12), \quad (2.1)$$

где  $C_i$  – концентрация углерода в пробе, г·л<sup>-1</sup>;

$N_i$  – концентрация азота в пробе, г·л<sup>-1</sup>;

12 и 14 – молярные массы углерода и азота соответственно, г·моль<sup>-1</sup>.

Определение содержания углерода и азота в пробах методом CHN-анализа проводилось ведущим инженером отдела экологической физиологии водорослей Кожемяка А.Б.

*Методика определения содержания органического углерода морских планктонных водорослей по величине оптической плотности их культур.* Известно, что величина оптической плотности суспензии водорослей связана с их концентрацией в среде, что позволяет определить содержание углерода в клеточной суспензии по оптическим измерениям. Это возможно при получении соответствующих калибровочных кривых, связывающих величину оптической плотности и концентрацию органического углерода в суспензии, определяемого аналитическим методом на CHN-анализаторе. Измерение оптической плотности осуществляется на длине волны 750 нм, на которой происходит поглощение света структурными элементами клеток (внутриклеточные компоненты, клеточные мембраны) и отсутствует селективное поглощение света пигментами фотосинтетического аппарата водорослей, которые в свою очередь характеризуются значительной вариабельностью в зависимости от условий выращивания. Данный метод широко используется в практике лабораторного культивирования микроводорослей как экспресс-метод определения концентрации клеток и измерения ростовых характеристик микроводорослей [11, 122].

Для построения калибровочных кривых определяли содержание органического углерода в пробе методом газо-адсорбционного хроматографического анализа на CHN-1 (метод описан выше) и параллельно измеряли оптическую плотность суспензий на спектрофотометре СФ-26 для культур водорослей различной концентрации. Для измерения оптической плотности водорослей суспензию помещали в кювету и измеряли величину пропускания относительно кюветы с непоглощающим раствором (морская вода). Использовали 10-сантиметровую цилиндрическую кювету ( $V=10 \text{ мм}^3$ ), для которой была изготовлена специальная приставка-держатель, устанавливаемая в кюветное отделение спектрофотометра. Ход измерения осуществляли согласно инструкции по эксплуатации прибора СФ-26.

Калибровочные зависимости между оптической плотностью и содержанием органического углерода в суспензии строили до начала эксперимента отдельно для каждого исследуемого вида водорослей. Использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, вегетирующие при освещенности  $35 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для интерполяции результатов была применена линейная функция (рисунок 2.2).

Относительная ошибка определения содержания углерода в пробе зависела от измеряемой концентрации суспензии. При минимальных концентрациях водорослей (до  $1 \text{ мг С} \cdot \text{л}^{-1}$ ), используемых в экспериментах, ошибка могла достигать 20 % измеряемой величины. Для основной массы измерений ( $1\text{-}15 \text{ мг С} \cdot \text{л}^{-1}$ ) относительная ошибка составляла  $< 5 \%$ .

Для проверки достоверности получаемых результатов в ходе эксперимента для выборочных проб проводили параллельное измерение содержания углерода по оптической плотности и методом газо-адсорбционного хроматографического анализа на газоанализаторе CHN-1. На рисунке 2.3 на примере *P. tricornutum* представлены некоторые результаты этих измерений, демонстрирующие отсутствие существенной зависимости полученных ранее калибровочных зависимостей от условий выращивания водорослей (различные фазы роста, температурные условия, степень обеспеченности азотом).

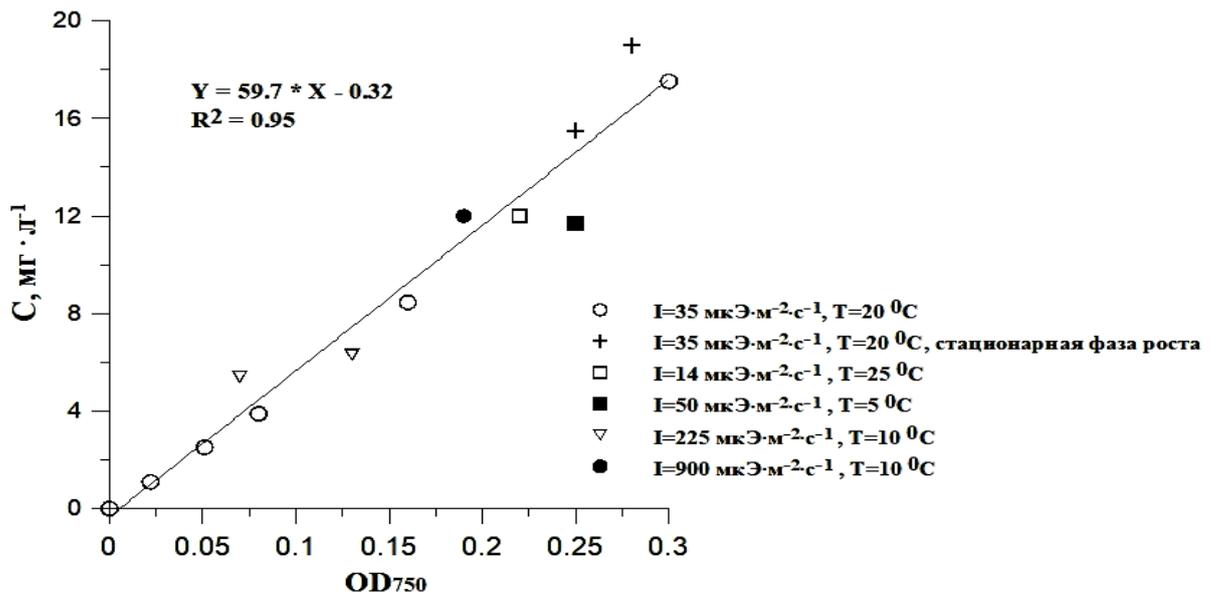
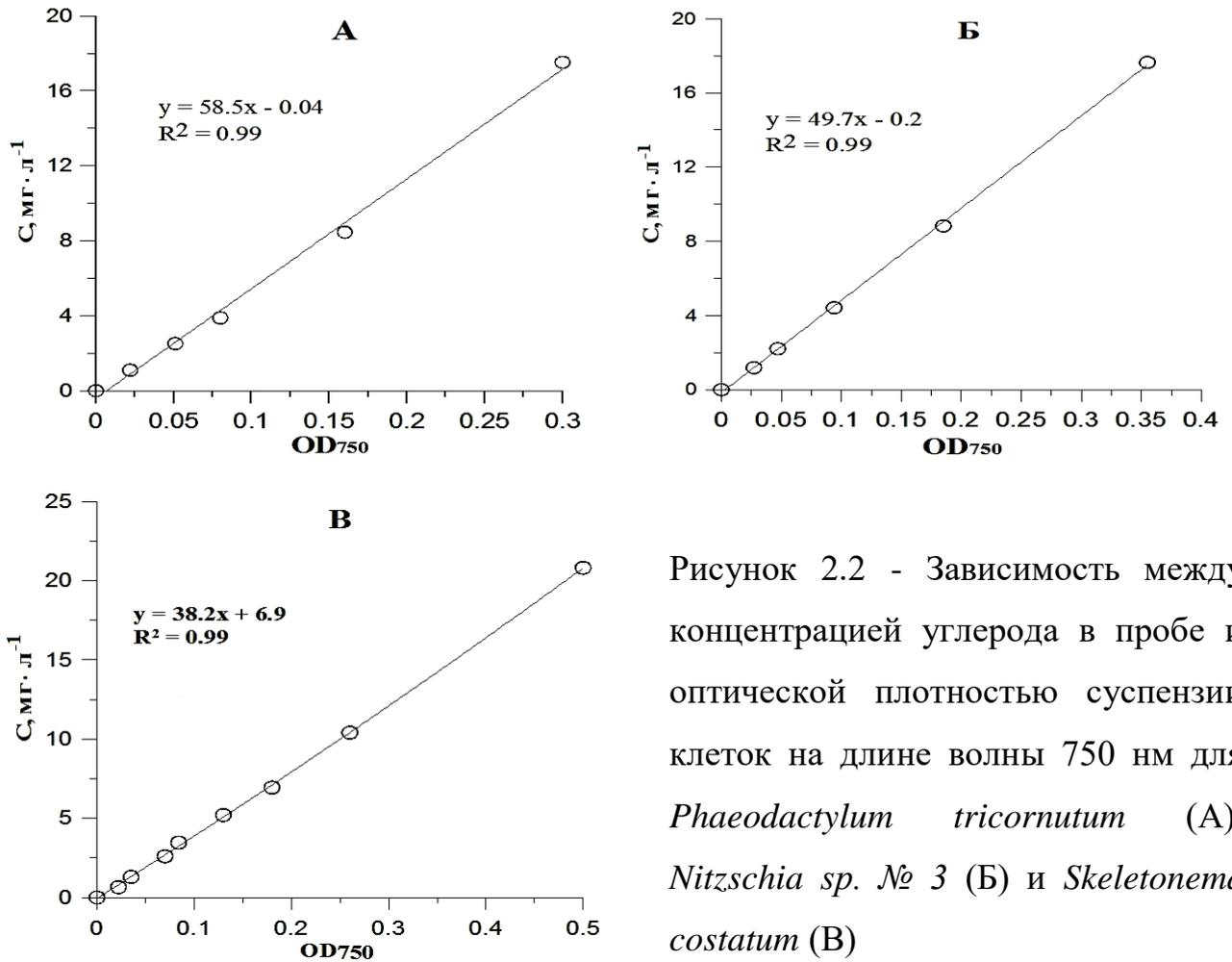


Рисунок 2.3 - Зависимость между концентрацией углерода в пробе и оптической плотностью суспензии клеток на длине волны 750 нм при различных условиях роста у *Phaeodactylum tricornutum*

*Расчет удельной скорости роста водорослей.* Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по приросту углерода в пробе по уравнению [39]:

$$\mu = \frac{\ln C_t - \ln C_0}{t}, \quad (2.2)$$

где  $\mu$  - удельная скорость роста, сут<sup>-1</sup>;

$C_0$  и  $C_t$  – исходная концентрация углерода и его количество через время  $t$ , мг·л<sup>-1</sup>;

$t$  – время между измерениями в сутках.

Зависимость удельной скорости роста водорослей от интенсивности света описывали с помощью уравнения (2.3). Общий вид этого уравнения соответствует математической зависимости, предложенной Галегосом с соавторами для описания изменения скорости фотосинтеза от освещенности с учетом фотоингибирования [95].

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{2} \cdot \tanh\left(\frac{\alpha \cdot I}{\mu_{\max}}\right) \cdot \left\{1 - \frac{I - I_b}{[(I - I_b)^8 + I_t^8]^{1/8}}\right\}, \quad (2.3)$$

где  $\mu$  – скорость роста водорослей при интенсивности света  $I$ , сут<sup>-1</sup>;

$\mu_{\max}$  - максимальная удельная скорость роста, сут<sup>-1</sup>;

$\alpha$  - начальный угол наклона  $\mu$ - $I$  зависимости, сут<sup>-1</sup>/(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>);

$I_t$  – интенсивность света, выше которой наблюдается ингибирование роста водорослей, мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>;

$I_b$  – интенсивность света, при которой  $\mu$  составляет 37 % от  $\mu_{\max}$ , в области ингибирующей освещенности, мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>.  $\mu_{\max}$  – теоретическая величина  $\mu_{\max}$ , рассчитанная в результате экстраполяции нисходящего участка  $\mu$ - $I$  кривой к оси скорости роста [149].

В тех случаях, когда  $\mu$ -I зависимость имела одновершинную форму (без плато) для ее математического описания использовали уравнение [95]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot [1 - \exp(-\frac{\alpha \cdot I}{\mu_{\max}})] \cdot \exp(-\frac{\beta \cdot I}{\mu_{\max}}), \quad (2.4)$$

где  $\beta$  – угол наклона нисходящего участка  $\mu$ -I зависимости в области ингибирующей освещенности, сут<sup>-1</sup>/(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>);  $\beta = \mu_{\max}/I_b$ .

*Спектрофотометрический метод определения концентрации хлорофилла a в культуре водорослей.* Для определения концентрации хлорофилла *a* в пробе фиксированное количество суспензии водорослей фильтровали через стекловолоконистые фильтры Whatman GF/C диаметром 15 мм при вакууме не более 0,2 атмосфер. Осевшую на фильтре взвесь экстрагировали 90 %-м раствором ацетона при температуре 8-10 °С в течение 18–24 ч. Полученный экстракт осветляли (удаление светорассеивающей взвеси) центрифугированием при скорости 3000 об./мин. в течение 10 минут. Оптическую плотность ацетоновых экстрактов измеряли на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Specord UV-VIS (KarlZeissJena).

Концентрацию хлорофилла *a* (Хл *a*) в пробе рассчитывали по уравнению [116]:

$$\text{Хл } a = (11.85 \cdot \text{OD}_{664} - 1.54 \cdot \text{OD}_{647} - 0.08 \cdot \text{OD}_{630}) \cdot \frac{V_{\text{экс}}}{V_{\text{пр}} \cdot L_k}, \quad (2.5)$$

где OD – оптическая плотность экстрактов при указанной длине волны с учётом поправки на неспецифическое поглощение при 750 нм;

$V_{\text{экс}}$  – объём ацетонового экстракта, мл;

$V_{\text{пр}}$  – объём профильтрованной культуры, л;

$L_k$  – длина кюветы, см.

*Фотометрический метод определения концентрации нитратов в морской воде и средах для культивирования водорослей.* Метод основан на восстановлении нитратов до нитритов, в качестве восстановителя применяется омедненный кадмий, а комплексообразующего агента – динатриевая соль ЭДТА (трилон Б). На первом этапе измерения 100 мл исследуемой пробы с добавлением щелочного раствора трилона Б пропускали через восстановительную колонку, наполненную омедненным кадмием, со скоростью одной капли в секунду, что обеспечивало наиболее полное восстановление нитратов до нитритов. Полнота восстановления нитратов составляла не менее 98 %. Первые 50 мл пробы, пропущенной через колонку, не учитывались, оставшиеся 50 мл отбирали для дальнейшего анализа. Для определения содержания нитритов, образовавшихся при восстановлении нитратов, применяли метод Бендшнайдера и Робинсона в модификации с использованием единого цветного реактива [20]. Метод основан на способности первичных ароматических аминов, в частности сульфаниламида, давать в присутствии азотистой кислоты диазосоединение, которое, вступая в реакцию азосочетания с N-(1-нафтил)этилендиамином, образует интенсивно окрашенный азокраситель. Максимум оптической плотности в спектре азокрасителя наблюдается при длине волны 543 нм. Измерение оптической плотности окрашенного исследуемого раствора проводили на спектрофотометре СФ-26. Расчет концентрации нитритов в пробе проводили по формуле:

$$N\text{-NO}_2 = K \cdot OD_{543}, \quad (2.6)$$

где  $N\text{-NO}_2$  - концентрация нитритов в пробе, мкМ;

$K$  – калибровочный коэффициент, рассчитанный на основании измерения оптической плотности стандартных растворов  $\text{NaNO}_2$ ;

$OD_{543}$  – оптическая плотность пробы на длине волны 543 нм.

Расчет содержания нитратов в пробе проводили по формуле:

$$N\text{-NO}_3 = K \cdot OD_{543} - N\text{-NO}_2, \quad (2.7)$$

где  $N\text{-NO}_3$  - концентрация нитратов в пробе, мкМ;

$K$  – калибровочный коэффициент, рассчитанный на основании измерения оптической плотности стандартных растворов  $KNO_3$ ;

$OD_{543}$  – оптическая плотность пробы на длине волны 543 нм;

$N\text{-NO}_2$  – содержание нитритов, рассчитанное по уравнению (2.6), мкМ.

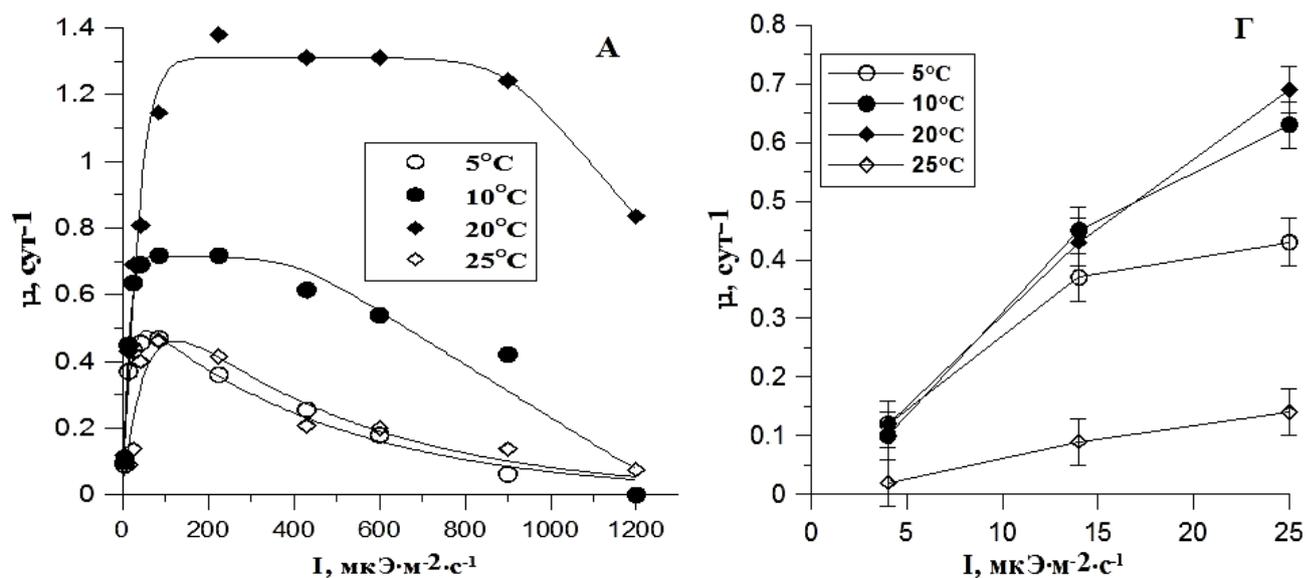
*Статистическая обработка результатов.* Базовая статистическая обработка данных - расчет средних арифметических, доверительных интервалов, ошибок средних и стандартных отклонений - выполнялась в пакете программы Excel 7.0. Достоверность отличий оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Для построения графиков и расчета коэффициентов параметрических зависимостей использовали Grapher 2.0.

### ГЛАВА 3 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА УДЕЛЬНУЮ СКОРОСТЬ РОСТА ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Световые зависимости удельной скорости роста диатомовых водорослей *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* при различной температуре приведены на рисунке 3.1. Значения основных параметров, описывающих полученные световые кривые, сведены в таблице 3.1.

Для каждого исследуемого вида водорослей шкала освещённости была условно разделена на 3 участка:

- 1) световой диапазон, в пределах которого свет оказывает лимитирующее действие на рост водорослей;
- 2) диапазон оптимальной интенсивности света, в пределах которого наблюдается максимальная скорость роста клеток;
- 3) участок световой кривой, где свет оказывает ингибирующее действие на рост водорослей вплоть до гибели клеток.



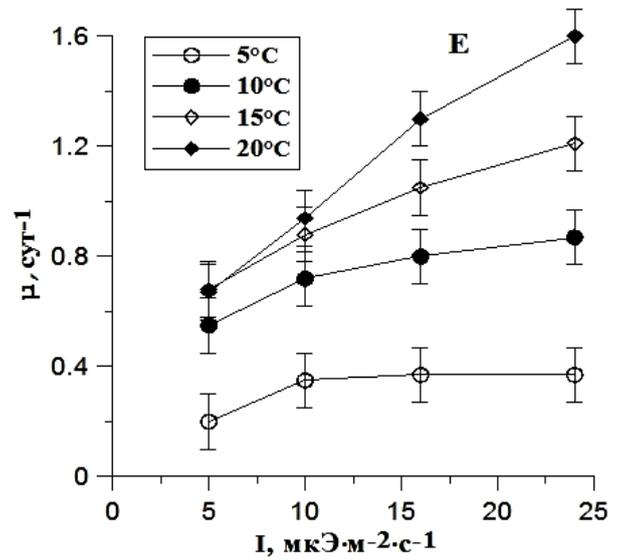
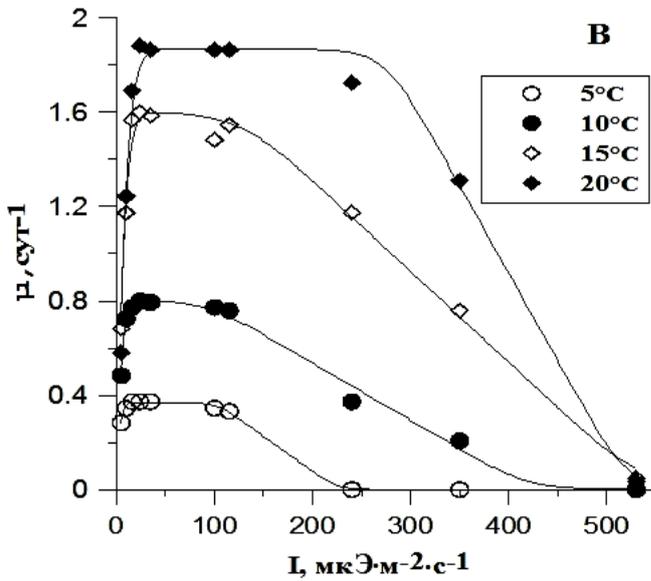
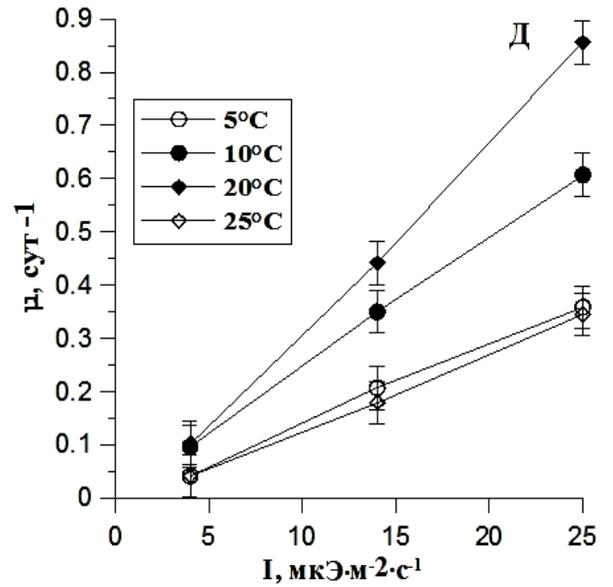
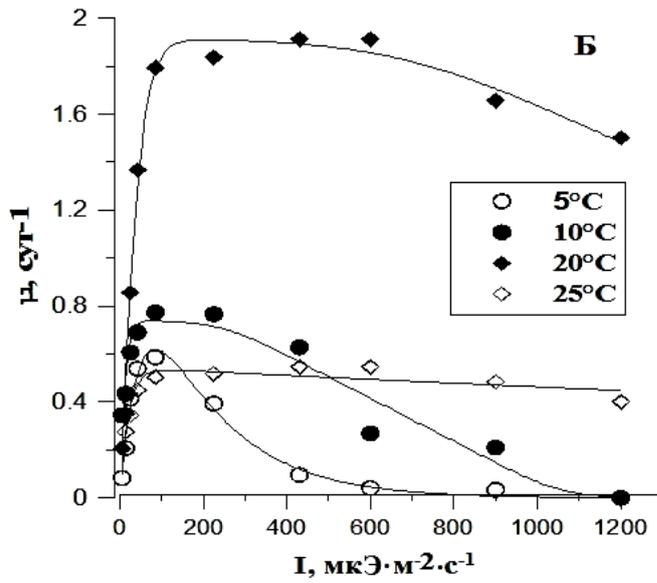


Рисунок 3.1 - Действие света и температуры на удельную скорость роста *P. tricornutum* (А, Г), *Nitzschia sp. № 3* (Б, Д) и *S. costatum* (В, Е). Точками на графиках обозначены экспериментальные данные, линиями - их математическое описание уравнением (2.3)

Таблица 3.1 - Основные параметры, описывающие зависимость удельной скорости роста *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* от интенсивности света (I) при различной температуре (T)

T, °C	$\alpha$ , сут <sup>-1</sup> · (МКЭ·М <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>	Ik, МКЭ·М <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$\mu_{\max}$ , сут <sup>-1</sup>	It, МКЭ· М <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	Ib, МКЭ· М <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>					
5	0,024	25	0,47	80	188
10	0,025	40	0,72	450	720
20	0,025	80	1,38	850	1725
25	0,017	66	0,46	150	230
<i>Nitzschia sp. № 3</i>					
5	0,012	49	0,59	85	200
10	0,022	33	0,77	230	430
20	0,024	83	1,90	600	3800
25	0,011	46	0,55	-	-
<i>Skeletonema costatum</i>					
5	0,065	12	0,37	100	163
10	0,110	18	0,87	120	254
15	0,140	24	1,6	140	330
20	0,140	35	1,86	280	400

### 3.1 Зависимость удельной скорости роста водорослей от температуры в условиях светового лимитирования

На начальном участке  $\mu$ -I кривой двумя основными параметрами, описывающими зависимость удельной скорости роста от интенсивности света, являются тангенс начального угла наклона ( $\alpha$ ) и насыщающая рост водорослей

интенсивность света ( $I_k$ ). При повышении температуры от 5 до 20 °С у *P. tricornutum* и от 10 до 20 °С у *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* начальный угол наклона  $\alpha$  не изменялся и составлял 0,024, 0,023 и 0,13 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup> для трех исследуемых видов соответственно. При изменении температуры от 20 до 25 °С эффективность роста у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* падала до 0,011–0,017 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>, а при 5 °С наблюдалось уменьшение  $\alpha$  у *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* до 0,012 и 0,065 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup> соответственно. Снижение начального угла наклона кривой роста во всех случаях коррелировало с общим падением скорости роста водорослей, что свидетельствует об угнетающем действии крайней из исследованных температур на физиологическое состояние клеток. Исходя из этого, следует полагать, что скорость роста на начальном линейном участке световой кривой определяется интенсивностью света. В свою очередь температурно-зависимое изменение угла наклона, наблюдаемое при 5 и 25 °С, вероятно, связано с изменением общего светопоглощения водорослями в условиях роста культур при субоптимальных температурах. Сама же величина светопоглощения водорослями, как известно, зависит от содержания хлорофилла и удельного коэффициента поглощения [124].

Полученные нами значения  $\alpha$  у *P. tricornutum* (0,024 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>) и *Nitzschia sp. № 3* (0,023 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>) сопоставимы с результатами одного из последних обзорных исследований [80], согласно которому преобладающая доля значений  $\alpha$  у диатомовых водорослей находится в диапазоне 0,015–0,03 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>. В целом авторами показано, что эффективность роста разных представителей фитопланктона в условиях светового лимитирования варьирует в пределах от 0,001 до 0,1 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>. Исходя из этого, высокое значение  $\alpha$ , полученное нами у *S. costatum* - 0,13 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup> – сопоставимо с максимально зарегистрированными значениями эффективности роста у микроводорослей. Эффективность роста *S. costatum* равная 0,1 и 0,18 сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup> отмечена также в работах [86] и [69] соответственно. Высокие значения угла  $\alpha$  указывают на то, что механизм адаптации вида к низкой освещенности заключался в повышении эффективности использования света на рост клеток.

Величина  $I_k$  в экспериментах с *P. tricornutum* возрастала от 25 до 80  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при изменении температуры от 5 до 20 °С. У *Nitzschia sp. № 3*  $I_k$  повышалась от 33 до 83  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  в температурном диапазоне 10-20 °С. Значения  $I_k$ , полученные при 5 °С у *Nitzschia sp. № 3* и при 25 °С у обоих видов, определялись совместным изменением  $\alpha$  и  $\mu_{\max}$  в зависимости от температуры культивирования. У *S. costatum* высокая эффективность роста ( $\alpha = 0,13 \text{ сут}^{-1}\cdot(\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1})^{-1}$ ) приводила к более раннему световому насыщению, чем у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3*. При повышении температуры от 5 до 20 °С  $I_k$  возрастала от 12 до 35. В практике гидробиологических исследований параметр  $I_k$  используется при сравнении генотипической теневыносливости или светолюбивости видов. В частности низкие значения  $I_k$ , наблюдаемые у *S. costatum*, свидетельствуют о тенелюбивости вида и способности развивать максимальную скорость роста при довольно низких значениях интенсивности света. Закономерно предположить, что это является одной из причин массового развития («цветения») *S. costatum* в Черном море в зимний - ранневесенний период при низких значениях ФАР и температуры [7].

### **3.2 Изменение максимальной удельной скорости роста водорослей в зависимости от температурных условий культивирования**

При интенсивности света, превышающей  $I_k$ , удельная скорость роста водорослей достигала максимальных значений. У *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* максимальная скорость роста повышалась от минимальных значений 0,5–0,6  $\text{сут}^{-1}$  при 5 °С до 1,4 и 1,9  $\text{сут}^{-1}$  при 20 °С соответственно (рисунок 3.2А). Дальнейшее повышение температуры до 25 °С приводило к ингибированию роста водорослей в среднем в 3 раза по сравнению со значениями при 20 °С. Возможно, это обусловлено увеличением скорости темновых реакций фотосинтеза при повышении температуры. Одновременно с этим при высокой температуре

происходит процесс инактивации хлоропластов [134]. У *S. costatum* изменение температуры от 5 до 20 °С сопровождалось увеличением удельной скорости роста от 0,4 до 1,9 сут<sup>-1</sup>.

Характер функциональной зависимости скорости роста от температуры активно обсуждается в литературе. В ряде исследований скорость роста водорослей моделируется как экспоненциальная функция температуры [65, 177]. В других работах для описания температурной зависимости скорости роста авторы используют линейную аппроксимацию данных [1, 142, 143, 182]. Ввиду того, что в нашем исследовании  $\mu$ -T зависимость представлена небольшим числом точек, для описания полученных результатов были применены оба подхода.

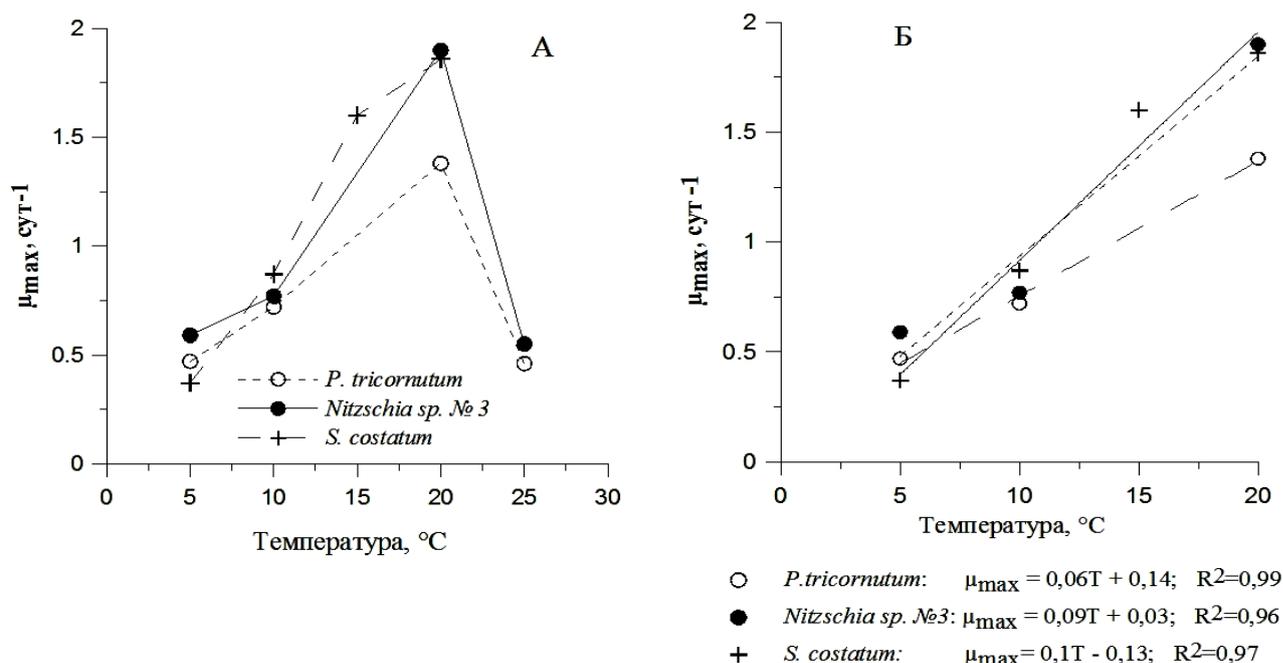


Рисунок 3.2 – Изменение максимальной удельной скорости роста *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. №3* и *S. costatum* в зависимости от температуры (А); линейная аппроксимация восходящего участка температурной зависимости  $\mu_{\max}$  исследуемых видов водорослей (Б)

Используя экспоненциальную аппроксимацию экспериментальных данных, нами был рассчитан температурный коэффициент  $Q_{10} = (\mu_2/\mu_1)^{10/(t_2-t_1)}$ , где  $\mu_1$  и

$\mu_2$  – скорости роста при температурах  $t_1$  и  $t_2$  соответственно. В температурном диапазоне от 5 до 10 °С значение  $Q_{10}$  составляло 2,3 для *P. tricornutum*, 1,7 для *Nitzschia sp. № 3* и 5,5 для *S. costatum*. При повышении температуры от 10 до 20 °С скорость роста *P. tricornutum* увеличивалась в 2 раза, *Nitzschia sp. № 3* – в 2,4 раза, а скорость роста *S. costatum* возрастала в 2,1 раза. Известно, что температурная зависимость ферментативных реакций описывается кривой Аррениуса, а значения коэффициента  $Q_{10}$ , равные 2-3, соответствуют типовым величинам для биохимических реакций [97, 153]. Однако при изучении ростовых характеристик сравниваются, по сути, различные популяции, в которых могут происходить адаптивные изменения, соответствующие условиям роста. В этом случае величины  $Q_{10}$  скорости роста могут сильно отличаться от 2, если температурные условия культивирования приводят к угнетению роста водорослей (зона пессимума к действию температурного фактора). Вероятно, высокое значение коэффициента  $Q_{10} = 5,5$ , наблюдаемое у *S. costatum* в температурном диапазоне от 5 до 10 °С, обусловлено нарушением функциональной активности водорослей при 5 °С. В ряде работ показано, что экспоненциальная функция не позволяет описать получаемые экспериментальные данные в широком диапазоне изменения температуры, ввиду чего значения коэффициента  $Q_{10}$  сильно отличаются от 2 [64, 140, 142]. В исследовании [140], к примеру, высказывается положение о том, что экспоненциальная зависимость скорости роста от температуры соблюдается только в области температур, близких к условиям вегетации видов в природных условиях. В работе [54] авторы приходят к выводу, что уравнение Аррениуса было первоначально разработано для прогнозирования влияния температуры на скорость химических реакций и не может предсказать негативное влияние экстремально низкой или высокой температуры на ферментативную активность в биологических системах.

В экспериментальной работе [1] для описания температурной зависимости скорости роста в широком диапазоне изменения температурного фактора авторами применена линейная функция вида  $\mu = a \cdot (t - t_0)$ , где  $a$  – угловой коэффициент регрессии, характеризующий изменение скорости роста при

повышении температуры на 1 °С,  $t_0$  - экстраполированное значение температуры нулевого роста. Применение этой зависимости относительно полученных нами данных показало, что угловой коэффициент регрессии температурной зависимости максимальной скорости роста составил 0,06, 0,09 и 0,1 сут<sup>-1</sup>·°С<sup>-1</sup> у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* соответственно (рисунок 3.2Б). Полученные значения коэффициентов хорошо согласуются с результатами, описанными в литературе. Так, в работе [142] на основе обобщения большого массива экспериментальных данных авторы приводят среднее значение углового коэффициента линейной регрессии порядка 0,07–0,08 сут<sup>-1</sup>·°С<sup>-1</sup>, при этом высказывается гипотеза о том, что такая величина коэффициента может быть константой для многих видов протистов. В исследовании [1] коэффициент «а» изменялся от 0,08 до 0,13 сут<sup>-1</sup>·°С<sup>-1</sup> у 6 видов диатомовых водорослей.

### **3.3 Влияние температуры на рост водорослей в условиях высокой освещенности**

Верхняя граница светового оптимума ( $I_t$ ), выше которой начинало проявляться световое ингибирование роста водорослей, значительно изменялась в зависимости от температурных условий культивирования. Понижение температуры приводило к более раннему фотоингибированию роста клеток всех исследуемых видов водорослей. Так, у *P. tricornutum* при 20 °С световые условия были благоприятными для роста до освещенности 850 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (см. рисунок 3.1А,Г). Понижение температуры до 10 °С сопровождалось сужением границ светового оптимума до 250 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, а при 5 °С максимальная скорость роста наблюдалась при освещенности, не превышающей 80 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Форма зависимости  $I_t$  от температуры имела линейный вид - снижение температуры культивирования на 1 °С приводило к сужению границ светового оптимума в среднем на 50 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (рисунок 3.3А). Аналогичные результаты получены и в экспериментах с *Nitzschia sp. № 3*. Верхняя граница оптимальной для роста

водорослей интенсивности света изменялась от  $600 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $230 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  и незначительно превышала  $I_k$  при  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  (см. рисунок 3.1Б,Д). Линейная аппроксимация результатов показала снижение величины  $I_t$  на  $35 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при изменении температуры на  $1 \text{ }^\circ\text{C}$ . У *S. costatum* линейной зависимости  $I_t$  от температуры не наблюдалось, при изменении температуры от  $20$  до  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  было отмечено двукратное снижение исследуемого параметра от  $280$  до  $140 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а в диапазоне от  $15$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$   $I_t$  слабо зависела от температуры культивирования ( $I_t = 100\text{-}140$ ). В целом результаты показывают, что *S. costatum* характеризуется повышенной чувствительностью к свету высокой интенсивности, так как даже при оптимальной температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , световое ингибирование роста начинает проявляться уже при освещенности около  $300 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Надо отметить, что достаточно низкие величины  $I_t$  у *S. costatum* согласуются с низкими значениями  $I_k$   $\mu\text{-I}$  зависимости и высокой эффективностью роста в условиях светового лимитирования, что в целом характеризует вид как тенелюбивый, обладающий высокой конкурентоспособностью в условиях низкой освещенности.

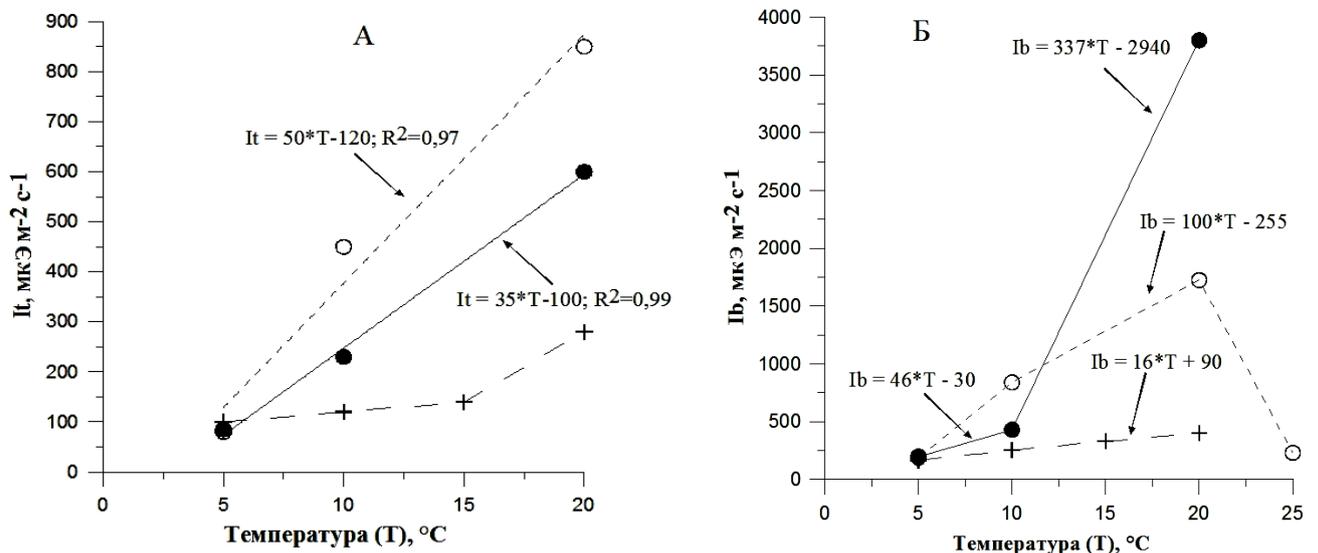


Рисунок 3.3 - Изменение верхней границы светового оптимума  $I_t$  (А) и степени светового ингибирования  $I_b$  (Б) у *P. tricornutum* (○), *Nitzschia sp. № 3* (●) и *S. costatum* (+) в зависимости от температуры культивирования

Культивирование водорослей при интенсивности света, превышающей  $I_t$ , приводило к угнетению их роста. У всех исследуемых видов снижение температуры усиливало ингибирующее действие света на рост клеток, что проявлялось не только в сужении диапазона оптимальной для их роста интенсивности света, но и в увеличении степени светового ингибирования. Так, у *P. tricornutum* при температуре 20 °С фотоингибирование скорости роста было отмечено только при максимальной освещенности в эксперименте ( $I = 1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) и выражалось в уменьшении  $\mu$  на 40 % относительно  $\mu_{\text{max}}$  (таблица 3.2). По мере снижения температуры культивирования процент фотоингибирования скорости роста, рассчитанный как  $\mu/\mu_{\text{max}} \cdot 100 \%$ , повышался. При 10 °С двукратное снижение  $\mu$  было зафиксировано при интенсивности света 800-900  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , а при 5 °С – уже при 400  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Повышение температуры до 25 °С также приводило к усилению фотоингибирования скорости роста *P. tricornutum* примерно до значений, наблюдаемых при 5 °С. У *Nitzschia sp. № 3* световое ингибирование при 20 °С было выражено слабо, значения удельной скорости роста снижались на 15-20 % относительно  $\mu_{\text{max}}$  при  $I = 900\text{--}1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . А при температуре 25 °С водоросли росли с максимальной скоростью вплоть до интенсивности света 1200  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Изменение процента фотоингибирования  $\mu$  относительно  $\mu_{\text{max}}$  при 10 и 5 °С отражено в таблице 3.2. К примеру, при интенсивности света 600  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  снижение температуры в эксперименте до 10 °С приводило к трехкратному уменьшению удельной скорости роста относительно ее максимального значения при этой температуре, а при 5 °С и указанной интенсивности света значения скорости роста снижались практически до нуля. У *S. costatum* при 20 °С отмечено относительно широкое световое плато  $\mu$ - $I$  зависимости и резкое падение значений скорости роста при освещенности выше 300  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . При интенсивности света 350  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  удельная скорость роста снижалась до 1,3 сут<sup>-1</sup>, что составляло 70 % от  $\mu_{\text{max}}$  при этой температуре, а уже при  $I = 530 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  рост водорослей снижался практически до нуля. При 15 и 10 °С двукратное снижение удельной скорости роста относительно ее максимальных значений было зафиксировано при 350 и 240  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$

соответственно. При 5 °С остановка роста водорослей была отмечена уже при 240  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

Таблица 3.2 - Влияние температуры на степень фотоингибирования скорости роста водорослей в условиях высокой освещенности,  $\mu/\mu_{\text{max}}\cdot 100\%$

Т, °С	Интенсивность света, $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$					
	85	225	430	600	900	1200
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>						
5	100	77	54	38	13	-
10	100	100	85	75	58	-
20	83	100	95	95	90	61
25	99	90	45	44	30	17
<i>Nitzschia sp. № 3</i>						
5	100	67	16	7	6	-
10	100	99	82	35	27	-
20	100	100	100	100	87	79
25	97	100	100	100	96	93
<i>Skeletonema costatum</i>						
5	100	90	-	-	-	-
10	100	95	47	26	-	-
15	100	97	73	47	3	3
20	100	99	96	70	2	2

Примечание:  $\mu$  - удельная скорость роста при интенсивности света  $I$  и температуре  $T$ ;  $\mu_{\text{max}}$  - максимальная удельная скорость роста при температуре  $T$ . Значения в таблице приведены в процентах

В уравнениях (2.1) и (2.2), описывающих  $\mu$ - $I$  зависимости, для количественной оценки степени светового ингибирования скорости роста применены 2 параметра -  $\beta$  и  $I_{\beta}$ .  $\beta$  - тангенс угла наклона нисходящего участка  $\mu$ - $I$

кривой, отражающий снижение скорости роста водорослей при изменении интенсивности света на  $1 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Этот параметр позволяет с высокой точностью описать степень фотоингибирования роста, но не применим для сравнения световых кривых, полученных при разной температуре, так как расчетное значение  $\beta$  зависит от  $\mu_{\max}$  и  $I_t$ , которые в свою очередь сами являются температурно-зависимыми величинами. Ввиду этого величины угла  $\beta$  не приводятся в представленной работе, а для количественной оценки совместного действия интенсивности света и температуры на степень фотоингибирования скорости роста применен параметр  $I_b$ .

Величина  $I_b$  отражает интенсивность света, при которой  $\mu$  составляет 37 % от  $\mu_{\max}$  в области высокой освещенности [149]. У *S. costatum* величина  $I_b$  снижалась от  $400 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $160 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  (рисунок 3.3Б). Безусловно, на основании 3-4 точек сложно сделать вывод о форме зависимости параметра  $I_b$  от температуры, но в первом приближении она близка к линейной – снижение температуры культивирования на  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  сопровождается уменьшением  $I_b$  примерно на  $16 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . При работе с *P. tricornutum* установлено снижение  $I_b$  от  $1725$  до  $188 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при изменении температуры от  $20$  до  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Линейная аппроксимация полученной температурной зависимости показала, что изменение величины  $I_b$  составило в среднем  $100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  на каждый градус температуры. При  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  наблюдалось снижение  $I_b$  до  $230 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , что примерно равно значению этого параметра при  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Как видно из представленных на рисунке 3.3Б данных у *Nitzschia sp. № 3* в температурном диапазоне  $5\text{-}10 \text{ }^\circ\text{C}$  величина  $I_b$  изменялась от  $200$  до  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  ( $46 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  на  $1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), а при изменении  $T$  от  $10$  до  $20 \text{ }^\circ\text{C}$   $I_b$  резко возрастала до  $3800 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  ( $337 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  на  $1 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Культивирование *S. costatum* при интенсивности света  $530 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  и температуре  $15\text{-}20 \text{ }^\circ\text{C}$  приводило к гибели культуры, а при  $10$  и  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  скорость роста водорослей была равна нулю уже при освещенности  $430$  и  $230 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  соответственно. У *P. tricornutum* при  $5$  и  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  гибель клеток наблюдалась при  $900$  и  $1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  соответственно, а у *Nitzschia sp. № 3* – при  $600$  и  $1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

В то время как при 20 °С оба вида росли с довольно высокой скоростью во всем исследуемом диапазоне интенсивности света.

Как уже было описано выше, основной причиной фотоингибирования фотосинтеза и роста является то, что при большом световом потоке скорость передачи энергии возбуждения от светособирающего комплекса к реакционным центрам превышает скорость передачи энергии на первичные реакции электронно-транспортной цепи [110]. В свою очередь культивирование водорослей при низкой температуре приводит к торможению диффузионных процессов в клетках и уменьшению скорости ферментативных процессов, которые ограничивают скорость роста водорослей [134]. Несмотря на разные механизмы, лежащие в основе, высокий свет и низкая температура оказывают сходное влияние на эффективность работы фотосинтетического аппарата водорослей – приводят к значительному снижению скорости транспорта электронов через ФС II [147] и дезактивации реакционных центров ФС II [66, 119]. Поэтому усиление фотоингибирования скорости роста водорослей при снижении температуры, вероятно, обусловлено взаимоусиливающимся эффектом действия двух однонаправленных факторов – высокого света и низкой температуры.

Высокие значения  $I_b = 3800 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , зафиксированное у *Nitzschia sp. № 3* при температуре 20 °С, и отсутствие фотоиндуцируемого ингибирования скорости роста при 25 °С свидетельствуют о повышенной устойчивости водорослей к действию света высокой интенсивности по сравнению с другими исследуемыми видами. Отметим, что при температуре 25 °С *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* по-разному реагировали на действие высокой освещенности. Так, у *Nitzschia sp. № 3* световое ингибирование не проявлялось вплоть до  $I = 1200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , в то время как у *P. tricornutum* фотоингибирование скорости роста было отмечено уже при освещенности около  $150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Известно, что вегетация водорослей при высоких температурах, выходящих за пределы диапазона их оптимальных значений, сопряжена со снижением функциональной активности клеток. Это обусловлено, прежде всего, рядом биохимических

трансформаций, происходящих в клетках при высокой температуре - денатурацией и плавлением белков, вовлеченных в фотосинтетические процессы, перекисным окислением мембранных липидов, инактивацией и денатурацией ферментов [139, 152]. В исследовании [1] показано, что культивирование водорослей при температуре, даже на несколько градусов превышающей температурный оптимум вида, приводило к прогрессирующему снижению числа жизнеспособных, активно делящихся клеток, а восстановление функциональной активности культуры имело длительный характер, либо наблюдалась гибель водорослей. В нашем исследовании как у *P. tricornutum*, так и у *Nitzschia sp. № 3* температурный оптимум скорости роста был зафиксирован при температуре 20 °С (см. рисунок 3.2А). Повышение температуры культивирования до 25 °С приводило к снижению максимальной скорости роста обоих видов в 3-3,5 раза, тангенса начального угла наклона  $\mu$ -I зависимости в 1,5-2 раза, раннему световому ингибированию у *P. tricornutum* ( $I_t = 150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ). Опираясь на имеющиеся данные, сложно объяснить, чем обусловлена высокая резистентность *Nitzschia sp. № 3* к действию света высокой интенсивности при 25 °С, наблюдаемая на фоне снижения остальных ростовых параметров. Вероятно, отмеченный отклик связан с индивидуальными особенностями адаптации клеток этого вида к высокотемпературному стрессу.

\* \* \*

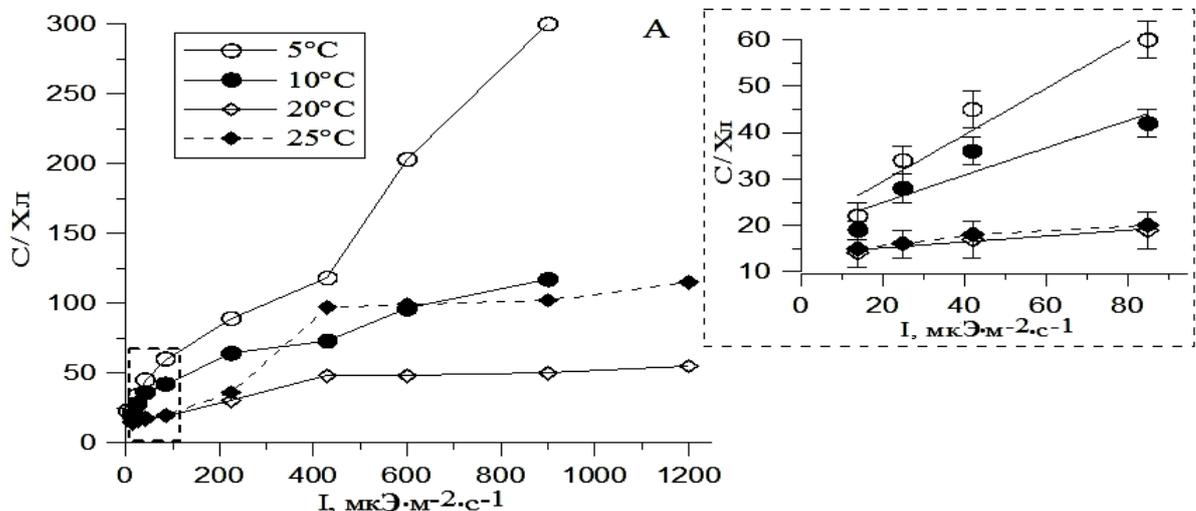
Таким образом, по результатам экспериментального исследования выявлены основные закономерности изменения удельной скорости роста диатомовых водорослей *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* в различных свето-температурных условиях. 1). Показано, что световая зависимость скорости роста, включая участок фотоингибирования, описывается уравнением с четырьмя коэффициентами –  $\alpha$ ,  $\mu_{\max}$ ,  $I_t$  и  $I_b$ . 2). Установлено, что тангенс начального угла наклона световой зависимости скорости роста ( $\alpha$ ) не зависит от температуры. 3). Температурный оптимум скорости роста всех исследуемых видов водорослей зафиксирован при температуре 20 °С. В оптимальных для роста клеток световых условиях температурный коэффициент  $Q_{10}$  изменяется в пределах от 1,7 до 2,5.

Высокие значения  $Q_{10}$  (выше 5), очевидно, свидетельствуют о выходе температуры за пределы адаптивных возможностей водорослей. При линейной аппроксимации восходящего участка  $\mu_{\max}$ -T кривой угловой коэффициент регрессии составляет 0,06, 0,09 и 0,1 сут<sup>-1</sup>·°C<sup>-1</sup> у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* соответственно. 4). Совместное действие света и температуры проявляется на участке светового ингибирования скорости роста водорослей. Понижение температуры приводит к сужению диапазона оптимальной для роста клеток интенсивности света и увеличению степени светового ингибирования. У *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* верхняя граница светового оптимума ( $I_t$ ) линейно уменьшается на 50 и 35 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> соответственно при снижении температуры на 1 °C. У *S. costatum*  $I_t$  слабо зависит от температуры в диапазоне 5-15 °C. Величина  $I_b$ , отражающая степень светового ингибирования скорости роста, снижается на 100 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> у *P. tricornutum* и на 16 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> у *S. costatum* при снижении температуры культивирования на 1 °C (в диапазоне 5-20 °C). У *Nitzschia sp. № 3* наблюдается неравномерное снижение величины  $I_b$  в зависимости от температуры. 5). У *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* повышение температуры от 20 до 25 °C приводит к снижению значений максимальной скорости роста в 3-3,5 раза, тангенса начального угла наклона  $\mu$ -I кривой в 1,5-2 раза, раннему световому ингибированию у *P. tricornutum* ( $I_t = 150$  мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>). 6). Выявлены некоторые индивидуальные особенности свето-температурной адаптации видов. Показано, что для *S. costatum* характерны высокая эффективность роста в условиях светового лимитирования, низкие значения параметров  $I_k$ ,  $I_t$  и  $I_b$ , что в целом характеризует вид как тенелюбивый, обладающий высокой конкурентоспособностью в условиях низкой освещенности. У *Nitzschia sp. № 3* выявлена высокая устойчивость к свету высокой интенсивности при 20 °C ( $I_b = 3800$  мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) и при 25 °C на фоне снижения остальных ростовых параметров.

## ГЛАВА 4 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОТНОШЕНИЕ УГЛЕРОДА К ХЛОРОФИЛЛУ *a* У ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

### 4.1 Влияние температуры на изменение параметров С/Хл-I зависимости у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum*

Характер зависимости отношения углерода к хлорофиллу *a* (далее С/Хл) от интенсивности света был однотипен у всех исследуемых видов водорослей (рисунок 4.1). В диапазоне низких освещенностей наблюдался быстрый рост величины отношения по мере увеличения плотности светового потока. При дальнейшем повышении интенсивности света скорость изменения С/Хл замедлялась, зависимость приобретала при этом вид кривой с насыщением, а при достижении определенной высокой освещенности (зависит от температуры и различается между видами) наблюдалось резкое возрастание величины отношения. Исходя из этого для анализа и интерпретации полученных результатов С/Хл-I зависимость была разделена на три участка: участок линейного (или близкого к линейному) повышения отношения С/Хл, световое плато и область светового ингибирования. Аналогичная градация была применена нами в отношении световой кривой скорости роста водорослей в подразделе 3.1.



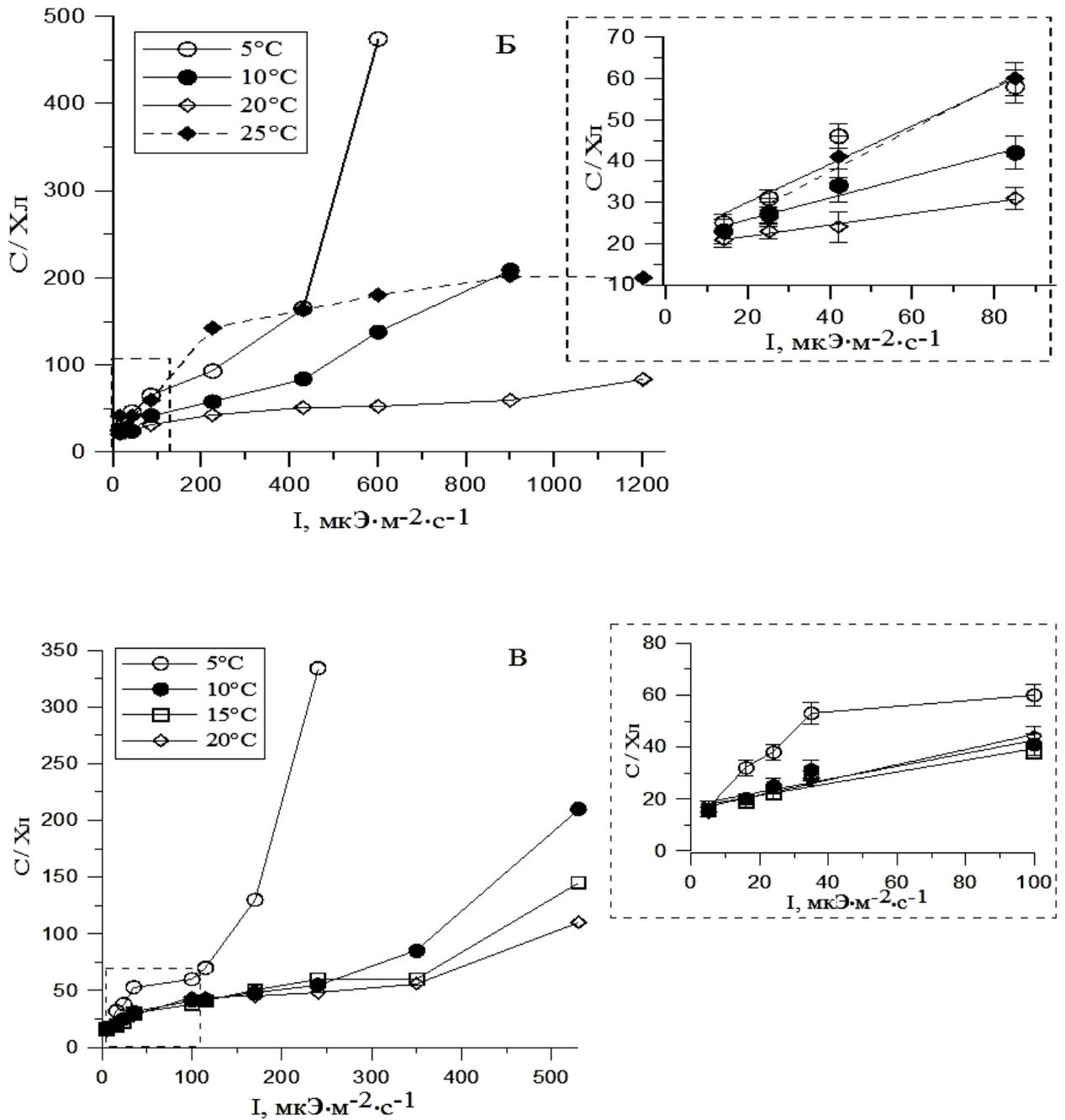


Рисунок 4.1 - Зависимость отношения  $C/X_{л}$  у *P. tricornutum* (А), *Nitzschia sp. № 3* (Б) и *S. costatum* (В) от световых и температурных условий роста. В пунктирных рамках показаны начальные участки представленных зависимостей

Для количественного описания результатов и сравнения световых зависимостей, полученных при различной температуре, в работе использовались следующие параметры:  $C/X_{лmin}$  и  $C/X_{лmax}$  - минимальное и максимальное значения отношения  $C/X_{л}$  при низкой и высокой интенсивности света;  $k$  -

начальный угол наклона световой зависимости отношения  $C/X_L$ ;  $I_{\text{plato}}$  - интенсивность света, при которой кривая  $C/X_L-I$  выходит на плато;  $I_{\text{crit}}$  - интенсивность света, выше которой наблюдается резкое повышение значений  $C/X_L$  при высокой освещенности (верхняя граница светового плато);  $b$  - угол наклона восходящего участка  $C/X_L-I$  зависимости при  $I > I_{\text{crit}}$ . Величины указанных параметров сведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 - Основные параметры, описывающие зависимость отношения  $C/X_L$  от интенсивности света у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* при различной температуре

T, °C	$C/X_{L\text{min}} \pm \text{sd}$ , мг·мг <sup>-1</sup>	k, (мгС·мгХЛ <sup>-1</sup> )· (мкЭ·м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>	$I_{\text{plato}}$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$I_{\text{crit}}$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$C/X_{L\text{max}}$ , мг·мг <sup>-1</sup>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>					
5	22 ± 3	0,80	-	430	300
10	19 ± 3	0,60	225	430	120
20	15 ± 2	0,10	430	-	55
25	15 ± 2	0,11	430	-	115
<i>Nitzschia sp. № 3</i>					
5	25 ± 3	0,52	100	225	475
10	23 ± 3	0,24	100	430	210
20	21 ± 3	0,10	225	-	85
25	23 ± 3	0,58	225	-	200
<i>Skeletonema costatum</i>					
5	17 ± 3	1,17	35	100	335
10	16 ± 2	0,49	100	350	210
15	16 ± 2	0,46	100	350	145
20	15 ± 2	0,43	100	350	110

#### 4.1.1 Влияние температуры на изменение отношения углерода к хлорофиллу $a$ в клетках при световом лимитировании роста водорослей

При температуре 20-25 °С минимальное отношение  $C/X_{л}$  в клетках водорослей наблюдалось при интенсивности света 14  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* (при  $I = 4 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  содержание хлорофилла в пробах определить не удалось из-за низкой плотности и ограниченного объема экспериментальных культур) и при 5  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *S. costatum*, значения отношения представлены в таблице 4.1. Для сравнения минимальное значение  $C/X_{л}$ , зафиксированное при работе с микроводорослями - 6,4 - получено при температуре 29 °С и низкой освещенности у сине-зеленой водоросли *Microcystis aeruginosa*, минимальное значение  $C/X_{л}$  для диатомей, равное 10, зарегистрировано у *P. tricornutum* при температуре 25 °С [117].

При одинаковой интенсивности света понижение температуры культивирования от 20-25 до 5 °С приводило к повышению величины  $C/X_{л_{\min}}$  у *P. tricornutum* от 15 до 22. У *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* достоверных различий в изменении значений  $C/X_{л_{\min}}$  при снижении температуры выявлено не было. Отметим, что данные, опубликованные ранее, описывают повышение  $C/X_{л_{\min}}$  со снижением температуры [89, 97, 99]. Так, в работе [97] автором на основе анализа литературных данных показано, что величина  $C/X_{л_{\min}}$  изменяется в диапазоне от 6 до 40 у разных представителей фитопланктона, при этом зависимость описываемого параметра от температуры носит линейный характер. В то же время в работе отмечено, что у видов *Leptocylindricus danicus* и *S. costatum* расчетные значения  $C/X_{л_{\min}}$  слабо зависели от температуры в диапазоне 0-22 °С. Линейная зависимость  $C/X_{л_{\min}}$  от температуры обсуждается также в исследовании [89], авторы показали, что угол наклона описываемой зависимости для разных систематических групп водорослей изменяется в довольно узком диапазоне – 0,8-1,07  $\text{мгС}\cdot\text{мгХл}^{-1}$  на 1 °С. Исключением являются зеленые микроводоросли, а также *Prochlorococcus* и диатомовая водоросль *S. costatum*, у которых корреляция

между минимальным отношением  $C/X_{л}$  в клетках и температурой культивирования не наблюдалась. Опираясь на имеющиеся в литературе данные, можно заключить, что повышение  $C/X_{л_{min}}$  является характерной реакцией клеток на снижение температуры у большинства представителей фитопланктона. В то же время, как показывают полученные нами результаты у *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* и некоторые литературные данные, описанные выше, для ряда видов водорослей такая зависимость не наблюдается. Имеющиеся данные не позволяют объяснить причину этих различий. Возможно, отсутствие температурной зависимости  $C/X_{л_{min}}$  связано с индивидуальными особенностями изменения содержания хлорофилла в клетках водорослей в различных вариантах сочетания интенсивности света и температуры.

На начальном участке  $C/X_{л-I}$  зависимости (область светового лимитирования) величина отношения  $C/X_{л}$  повышалась пропорционально увеличению плотности светового потока при всех исследуемых температурах. Для данного участка световой кривой характерна максимальная скорость изменения внутриклеточной концентрации хлорофилла, отражающая адаптационные трансформации в фотосинтетическом аппарате водорослей в ответ на изменение световых условий роста. Так как основной «задачей» клетки при адаптации к свету слабой интенсивности является повышение вероятности захвата фотонов света, что в первую очередь достигается путем увеличения количества светособирающих пигментов, в частности хлорофилла *a* [109]. Снижение температуры в эксперименте приводило к повышению начального угла наклона ( $k$ )  $C/X_{л-I}$  зависимости, что отражено на графиках веерообразной формой световых кривых при разной температуре (см. рисунок 4.1). Так, у *P. tricornutum* угол  $k$  экспоненциально возрастал от  $0,1 \text{ (мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot \text{(мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  при 20 и 25 °С до  $0,8 \text{ (мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot \text{(мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  при 5 °С, у *Nitzschia sp. № 3* при снижении температуры от 20 до 5 °С угол  $k$  повышался от 0,1 до 0,5 (рисунок 4.2). При 25 °С отмечено существенное различие в изменении описываемого параметра у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3*. Так, у *P. tricornutum* значения угла  $k$  при 20 и 25 °С не различались, а у *Nitzschia sp. № 3* отмечено снижение начального угла

наклона до значения, наблюдаемого при 5 °С. В целом надо отметить, что величины скорости роста и отношения  $C/X_{л}$ , полученные у *Nitzschia sp. № 3* при 5 и 25 °С, не различались до освещенности 85-100 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. В то же время в экспериментах со *S. costatum* в температурном диапазоне 10–20 °С угол  $k$  не изменялся и был равен 0,4–0,5 (мгС·мгХл<sup>-1</sup>)·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>, а при 5 °С его величина повышалась до 1,2 (мгС·мгХл<sup>-1</sup>)·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>, что согласуется с двукратным снижением величины угла  $\alpha$   $\mu$ -I зависимости при этой температуре.

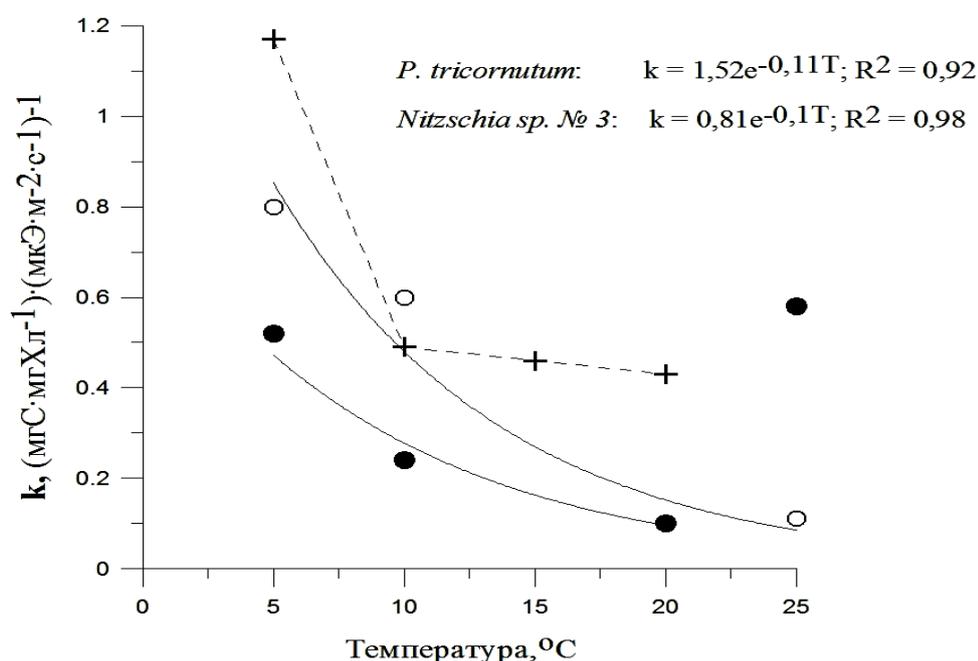


Рисунок 4.2 – Влияние температуры на изменение начального угла наклона ( $k$ ) световой зависимости отношения  $C/X_{л}$  у *P. tricornutum* (○), *Nitzschia sp. № 3* (●) и *S. costatum* (+)

Увеличение начального угла наклона зависимости  $C/X_{л}$ -I при снижении температуры свидетельствует о более сильном влиянии низкой температуры на синтез хлорофилла по сравнению с процессами накопления других клеточных компонентов. Уменьшение содержания пигмента при низкой температуре направлено на снижение окислительного стресса, вызванного образованием радикальных групп в фотосистемах и генерацией активных форм кислорода [26],

что с физиологической точки зрения является адаптивной реакцией, способствующей повышению выживаемости клеток. В то же время снижение относительной скорости синтеза хлорофилла у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* при 10 и 5 °С в условиях светового лимитирования приводит к снижению поглощенной клетками световой энергии.

#### 4.1.2 Влияние температуры на изменение параметров С/Хл-I зависимости в условиях светового насыщения роста водорослей

Диапазон интенсивности света, в пределах которого наблюдался линейный или близкий к линейному рост значений С/Хл сужался по мере снижения температуры культивирования (см. рисунок 4.1). Верхней границей этого диапазона принималась интенсивность света, при которой был отмечен выход С/Хл-I зависимости на плато –  $I_{\text{plato}}$ . Так, у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* повышение величины С/Хл при 20-25 °С наблюдалось до освещенности 430 и 225  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  соответственно. При 10 °С этот диапазон сужался примерно до 225  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *P. tricornutum* и до 100  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *Nitzschia sp. № 3*. При 5 °С величина  $I_{\text{plato}}$  у *Nitzschia sp. № 3* составляла 100  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , в то время как у *P. tricornutum* при этой температуре световое плато не наблюдалось, отмечено только замедление скорости изменения параметра С/Хл от света в диапазоне освещенности 200-430  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , ввиду чего установить величину  $I_{\text{plato}}$  не удалось. У *S. costatum* при 10, 15 и 20 °С отношение С/Хл трехкратно повышалось (от 15 до 40–45) в световом диапазоне 5–100  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а при 5 °С повышение отношения углерода к хлорофиллу наблюдалось до интенсивности света 35  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Низкие значения  $I_{\text{plato}}$  у *S. costatum* согласуются с такими же низкими значениями  $I_{\text{k}}$  по росту для этого вида. Следует отметить, что это ниже значений, получаемых для *S. costatum* другими авторами [124, 162, 185]. В работе [185] у *S. costatum* отмечено линейное повышение величины С/Хл с ростом

освещенности до  $100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  как при 10, так и при 22 °С. В исследовании [124] выход световой зависимости С/Хл на плато у *S. costatum* наблюдался примерно при  $200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , сама величина отношения изменялась при этом от 18 при  $15 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до 70 при  $200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Возможно, полученное расхождение результатов связано с тем, что мы выращивали водоросли при непрерывном освещении, а в указанных работах был введен темновой период. Кроме того, причина может заключаться в функциональных различиях между отдельными штаммами *S. costatum*.

Под световым плато С/Хл-I зависимости подразумевался диапазон интенсивности света, в пределах которого величина С/Хл сохраняла относительно постоянное значение, изменение показателя не превышало 25 %. Ширина плато зависела от температуры культивирования водорослей в эксперименте. Так, при температуре 20 и 25 °С у *P. tricornutum* величина С/Хл находилась на плато в широком диапазоне освещенности от 430 до  $1200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , у *Nitzschia sp. № 3* - от 225 до  $1200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а у *S. costatum* - от 100 до  $350 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  (см. рисунок 4.1). При понижении температуры область плато сужалась и сменялась резким повышением отношения С/Хл при увеличении интенсивности света выше определенного критического значения Icrit (верхняя граница светового плато). При 10 °С у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* Icrit составила  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а при 5 °С значения описываемого параметра были равны  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *P. tricornutum* и  $225 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *Nitzschia sp. № 3*. На наш взгляд, величина Icrit, полученная у *P. tricornutum* при 5 °С, несколько завышена, что обусловлено отсутствием измерений С/Хл в диапазоне между 225 и  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . Вполне вероятно, что в пределах этого светового диапазона «скрыто» и световое плато С/Хл-I зависимости. Ингибирующее действие света на отношение С/Хл у *S. costatum* при 10–20 °С начинало проявляться при освещенности, превышающей  $350 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . При температуре 5 °С значение Icrit у *S. costatum* составило  $100 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

В пределах светового плато минимальные значения отношения С/Хл были отмечены при температуре 20 °С, являющейся оптимальной для роста всех

исследуемых видов. У *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* как снижение, так и повышение температуры в эксперименте (относительно 20 °С) приводило к уменьшению внутриклеточного содержания хлорофилла. Изменение температуры культивирования от 20 до 10 °С сопровождалось повышением отношения С/Хл в клетках примерно в 1,5 раза. При дальнейшем понижении температуры от 10 до 5 °С С/Хл повышалось в среднем еще в 1,5 раза у обоих видов. Изменение температуры в эксперименте от 20 до 25 °С приводило к повышению С/Хл в 2 раза у *P. tricornutum* и 3-3,5 раза у *Nitzschia sp. № 3*. В то же время при работе со *S. costatum* температурной зависимости отношения С/Хл в диапазоне 10–20 °С выявлено не было.

Адаптивные преобразования в клетке являются физиологическим откликом организма на меняющиеся условия роста и направлены на оптимизацию энергетического баланса, необходимого для поддержания скорости роста водорослей на максимально возможном уровне. Исходя из этого, снижение содержания хлорофилла в клетке при снижении или повышении температуры относительно ее оптимального значения следует интерпретировать как адаптивную реакцию, основанную на распределении клеточных ресурсов между не зависящими от температуры биофизическими реакциями (отвечают за сбор фотонов света) и температурно-зависимыми биохимическими реакциями. Такой способ адаптации пигментной системы водорослей к меняющимся условиям роста известен как «хлорелла тип» адаптации [9]. Анализ имеющихся в литературе данных по температурно-зависимому изменению содержания хлорофилла у водорослей в условиях светового насыщения показал, что снижение температуры от 20–30 до 5-10 °С приводит к повышению внутриклеточного отношения С/Хл примерно в 2-5 раз [61, 97, 174, 185]. К примеру, при работе с *Thalassiosira weissflogii* установлено, что в температурном диапазоне 21-29 °С отношение С/Хл было практически постоянно, в то время как снижение температуры выращивания от 21 до 13 °С сопровождалось линейным повышением С/Хл в 2-2,5 раза [174]. В исследовании [97] показано, что С/Хл в клетках водорослей повышается при низкой температуре и это повышение в

большей степени проявляется при высокой освещенности, зависимость  $C/Xл$  от света линейна во всем диапазоне изменения освещенности, а угол наклона световых кривых, полученных при разной интенсивности света, экспоненциально возрастает со снижением температуры. Результаты же нашего исследования на примере двух видов диатомовых водорослей показывают, что в условиях светового насыщения интенсивность света и температура выступают как два независимых друг от друга фактора, а их совместное действие на изменение внутриклеточного отношения  $C/Xл$  носит аддитивный характер.

Существует и другой путь адаптации фотосинтетического аппарата водорослей к изменению температурных условий роста - перестройка активности ферментных систем и скорости протекания энзимных процессов, при этом содержание пигментов в клетках остается неизменным. Такой способ адаптации был обнаружен у диатомовой водоросли *Cyclotella meneghiniana* [5] и получил название «циклотелла тип». Помимо *C. meneghiniana* энзимный путь адаптации к изменению условий среды был выявлен еще у ряда зеленых и диатомовых водорослей, в том числе и у *S. costatum* [9]. Вероятно, это и объясняет отсутствие температурной зависимости отношения  $C/Xл$  у *S. costatum* в нашем исследовании в диапазоне 10-20 °С. В то же время при температуре 5 °С у описываемого вида нами отмечено значительное изменение всех коэффициентов  $C/Xл-I$  зависимости – двукратное повышение начального угла наклона, трехкратное снижение значений  $I_{рlato}$  и  $I_{crit}$ , гибель культуры при интенсивности света  $230 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ .

#### 4.1.3 Влияние температуры на изменение отношения $C/Xл$ $a$ в условиях светового ингибирования

В области высокой освещенности, где проявлялось ингибирующее действие света на рост водорослей ( $I > I_{crit}$ ), при 5 и 10 °С наблюдалось резкое увеличение величины отношения  $C/Xл$  в клетках, в то время как при 20 и 25 °С этот эффект у

*P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* отсутствовал и был слабо выражен у *S. costatum*. У всех исследуемых видов снижение температуры культивирования приводило к повышению степени фотодеструктивного разрушения хлорофилла в клетках водорослей, что выражалось в снижении величины параметра  $I_{crit}$  (см. подраздел 3.2.2), повышении угла наклона (b) восходящего участка C/Хл-I зависимости при  $I > I_{crit}$  и повышении значений  $C/X_{L_{max}}$ .

Значения угла наклона восходящего участка C/Хл-I зависимости при  $I > I_{crit}$ , полученные при разной температуре, приведены в таблице 4.2. Описываемый параметр отражает изменение величины C/Хл при повышении интенсивности света на  $1 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и позволяет сравнить степень ингибирующего воздействия освещенности на изменение C/Хл в различных температурных условиях роста водорослей. Так, при температуре  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  в диапазоне интенсивности света 430-900  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  было отмечено повышение отношения C/Хл от 75 до 120 у *P. tricornutum* и от 85 до 200 у *Nitzschia sp. № 3*, угол наклона описываемых зависимостей составил 0,09 и 0,26  $(\text{мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  соответственно. При  $5 \text{ }^\circ\text{C}$   $C/X_{L_{max}}$  достигало 300 у *P. tricornutum* и 475 у *Nitzschia sp. № 3*, угол наклона кривых при этом был равен 0,38 и 0,99  $(\text{мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$ . Свет интенсивностью  $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  как при  $10$ , так и при  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  вызывал остановку роста *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3*, а впоследствии приводил к гибели культур. Ингибирующее действие света на отношения C/Хл у *S. costatum* при  $10$ – $20 \text{ }^\circ\text{C}$  проявлялось при освещенности выше  $350 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . В световом диапазоне  $350$ – $530 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  C/Хл возрастал в 2 раза при  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  и в 4 раза при  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , достигая 110 и 210 соответственно. При температуре  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  и интенсивности света  $240 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  отношение  $C/X_{L_{max}}$  было равно 335, а при  $I > 240 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  водоросли быстро погибали. Угол наклона восходящего участка C/Хл-I зависимости в области высоких освещенностей изменялся от  $0,28 (\text{мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  при  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  до  $2,26 (\text{мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  при температуре  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , зависимость при этом имела степенной вид:  $b = 23,8 \cdot T^{-1,5}$ ,  $R^2=0,9$ .

В условиях высокой плотности светового потока изменение внутриклеточного содержания хлорофилла непосредственно связано со скоростью роста водорослей (рисунок 4.3). При температуре 20 °С *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* характеризовались высокой удельной скоростью роста ( $\mu = 1-1,9 \text{ сут}^{-1}$ ). При этом значения отношения С/Хл не превышали 100. При снижении температуры культивирования наблюдалось уменьшение скорости роста и значительное повышение величины С/Хл у водорослей. При этом высокие значения С/Хл (100-500) отмечались у клеток с низкой функциональной активностью – удельная скорость роста не превышала  $0,5 \text{ сут}^{-1}$ . Аналогичные результаты получены и для *S. costatum* - замедление роста культуры ( $\mu < 0,3 \text{ сут}^{-1}$ ) сопровождалось повышением значений С/Хл выше 100.

Таблица 4.2 - Влияние температуры на изменение угла наклона  $\nu$  восходящего участка световой зависимости С/Хл при  $I > I_{crit}$

Вид	Т, °С				
	5	10	15	20	25
<i>P. tricornutum</i>	0,38	0,09	-	НФ	НФ
<i>Nitzschia sp. № 3</i>	0,99	0,26	-	НФ	НФ
<i>S. costatum</i>	2,26	0,74	0,47	0,28	-

Примечание: значения в таблице приведены в  $(\text{мгС} \cdot \text{мгХл}^{-1}) \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$ . НФ – фотоингибирование не наблюдалось; прочерк означает, что определение величины С/Хл при указанной температуре не проводилось

Известно, что в условиях светового ингибирования скорость передачи энергии возбуждения от светособирающего комплекса к реакционным центрам превышает способность хлоропластов использовать ее в фотохимических реакциях [110]. В условиях блокирования переноса электронов из-за образования их избытка в цепи фотосинтеза усиливается генерация активных форм кислорода, приводящая к окислительному стрессу. В качестве защитного механизма в клетке происходит распад белков реакционных центров, что в свою очередь приводит к

инактивации самих реакционных центров и прекращению фотосинтеза и роста [26]. При этом остановка синтетических процессов в клетке при световом ингибировании происходит на фоне интенсивного фотоокисления антенного хлорофилла [110]. Снижение температуры, усиливая процесс фотоокисления хлорофилла, вероятно, приводит к более быстрому снижению его концентрации в клетках, что отражается в высоких значениях отношения  $C/X_{л}$ . Результаты нашего исследования экспериментально подтверждают эту теорию. Длительное культивирование водорослей в условиях высокой освещенности и низкой температуры может привести (в зависимости от крайних значений этих факторов) либо к гибели культуры, либо к ее адаптивному восстановлению с повышением скорости роста и снижением отношения  $C/X_{л}$  (см. подраздел 4.3).

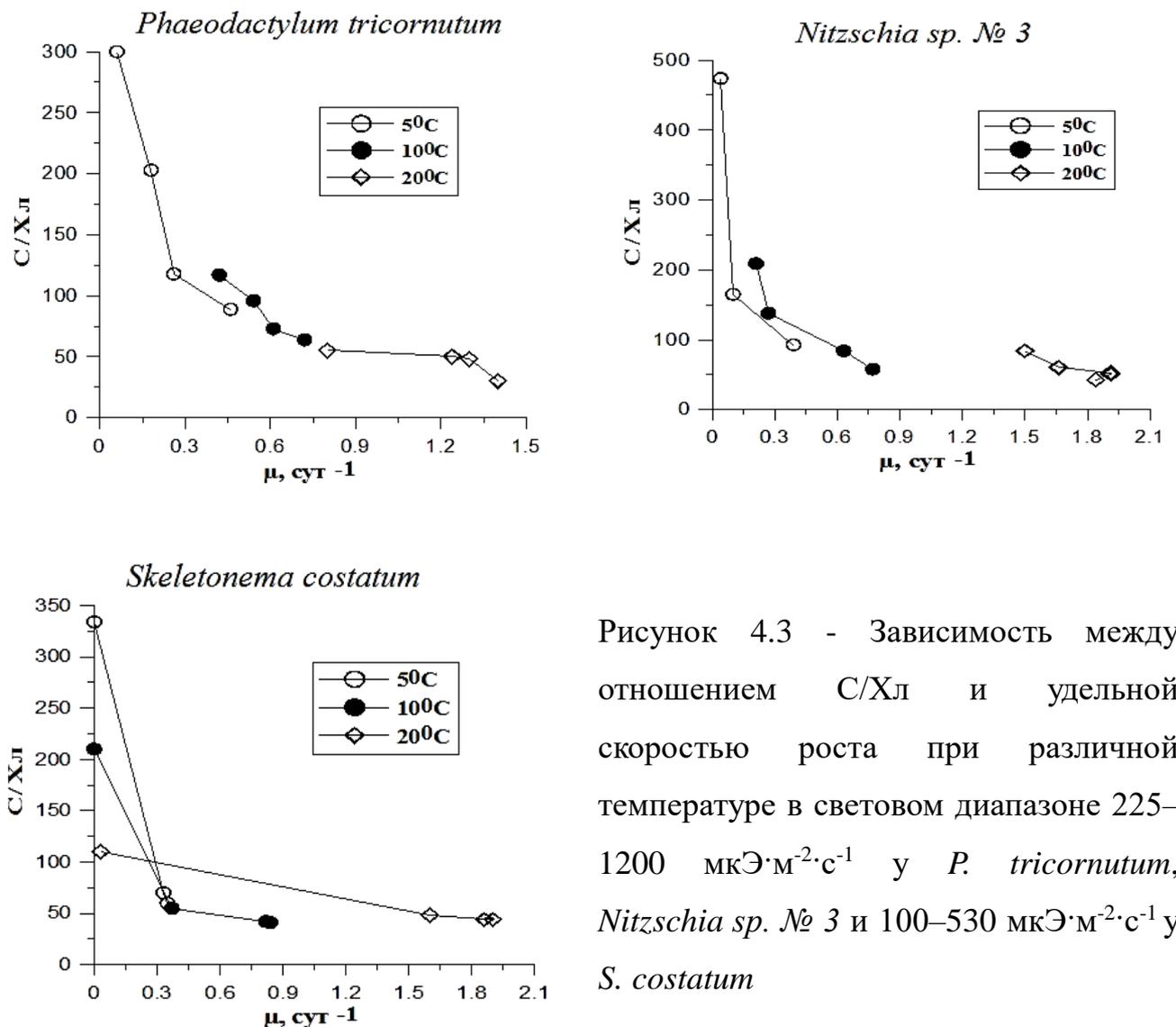


Рисунок 4.3 - Зависимость между отношением  $C/X_{л}$  и удельной скоростью роста при различной температуре в световом диапазоне 225–1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и 100–530  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у *S. costatum*

Таким образом, по результатам экспериментального исследования выявлены основные закономерности изменения внутриклеточного отношения С/Хл у диатомовых водорослей *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* в различных световых и температурных условиях роста:

1. Показано, что диапазон изменения отношения С/Хл определяется световыми условиями и температурой выращивания водорослей. У всех исследуемых видов при оптимальной для роста температуре 20 °С величина С/Хл в широком световом диапазоне (14-1200 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3*, 5-350 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> у *S. costatum*) изменялась от 15 до 60–85. Понижение температуры в эксперименте до 10 °С приводило к увеличению максимального значения С/Хл до 120–200, а при 5 °С – до 300 и выше. В целом значения отношения С/Хл а выше 100 характерны для клеток с низкой функциональной активностью – удельная скорость роста не превышает 0,5 сут<sup>-1</sup>

2. Показаны два типа возможного адаптационного отклика фотосинтетического аппарата водорослей на изменение температурных условий роста (справедливо для значений  $I < I_{crit}$ ):

а) температурно-зависимое изменение содержания хлорофилла в клетке, направленное на согласование скоростей световых и темновых реакций фотосинтеза. Такой тип температурной адаптации отмечен у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3*. При лимитирующей рост интенсивности света снижение температуры от 20 до 5 °С приводило к экспоненциальному повышению начального угла наклона (k) С/Хл-I зависимости в 8 раз у *P. tricornutum* и в 5 раз у *Nitzschia sp. № 3*. В оптимальных световых условиях совместное действие интенсивности света и температуры на изменение отношения С/Хл носило аддитивный характер: при снижении температуры от 20 до 10 °С и от 10 до 5 °С отношение С/Хл повышалось в 1,5 раза у обоих видов, в свою очередь изменение температуры от 20 до 25 °С приводило к повышению С/Хл в 2 раза у *P. tricornutum* и 3-3,5 раза у *Nitzschia sp. № 3*.

б) содержание хлорофилла в клетке не зависит от температуры культивирования, адаптация фотосинтетического аппарата в данном случае, вероятно, происходит за счет изменения активности ферментных систем и скорости протекания энзимных процессов. Такой путь температурной адаптации отмечен у *S. costatum*. Изменение температуры не влияло на величину отношения С/Хл в диапазоне 10–20 °С.

3) В области высокой освещенности ( $I > I_{crit}$ ) при 5 и 10 °С отмечено резкое увеличение отношения С/Хл в клетках, в то время как при 20 и 25 °С этот эффект у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* отсутствовал и был слабо выражен у *S. costatum*. У всех исследуемых видов понижение температуры культивирования приводило к прогрессирующему уменьшению содержания хлорофилла в клетках водорослей, вызванному снижением скорости синтеза хлорофилла на фоне его интенсивного фотоокисления, что выражалось в уменьшении величины параметра  $I_{crit}$ , повышении угла наклона восходящего участка С/Хл- $I$  зависимости при  $I > I_{crit}$  и повышении значений  $C/X_{l_{max}}$  по мере снижения температуры.

#### **4.2 Изменение содержания хлорофилла *a* в клетках *Phaeodactylum tricornutum* при экстремально низкой освещенности**

В ходе основного эксперимента (эксперимент № 1) с *P. tricornutum* и *Nitzschia sp. № 3* не удалось установить характер свето-температурного изменения отношения С/Хл при интенсивности света ниже  $14 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  (из-за низкой плотности и ограниченного объема экспериментальных культур). В связи с этим, было проведено дополнительное исследование динамики отношения С/Хл в условиях экстремально низкой интенсивности света. В ходе эксперимента водоросли выращивали при  $I = 1,5; 3; 6; 10; 15 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  – и двух температурах – 10 и 20 °С (эксперимент № 2). Полученные результаты представлены на рисунке 4.4.

В исследуемом диапазоне освещенности скорость роста водорослей не зависела от температуры культивирования, значения, полученные при 10 и 20 °С, были примерно равны. Такой результат еще раз подтверждает, что в условиях низкой освещенности рост водорослей определяется преимущественно количеством поглощенной клетками световой энергии и не зависит от температурных условий культивирования.

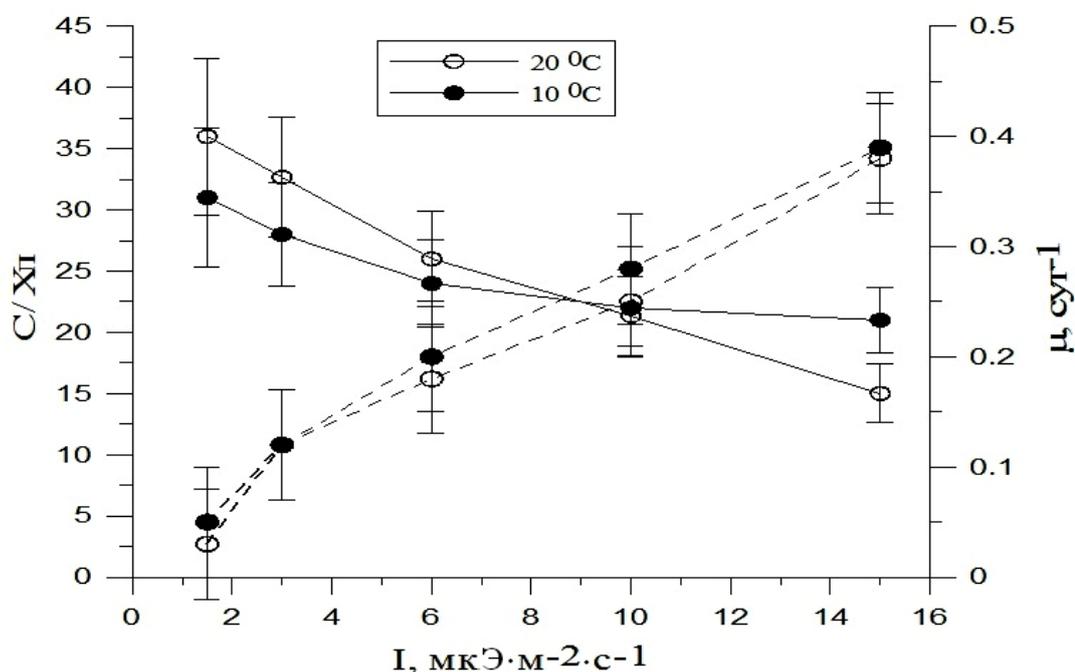


Рисунок 4.4 - Изменение отношения  $C/X_l$  (—) и удельной скорости роста (---) у *P. tricornutum* при экстремально низкой интенсивности света

Минимальное отношение  $C/X_l$  в эксперименте было зафиксировано при освещенности 15  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  и составило в среднем 15 при 20 °C и 21 при 10 °C. При интенсивности света ниже 15  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  величина отношения  $C/X_l$  постепенно повышалась, достигая 30-37 при  $I = 1,5-2$   $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . В литературе неоднократно описывались случаи повышения отношения  $C/X_l$  при крайне низких значениях освещенности. Так, в исследовании [174] показано, что у *Thalassiosira weissflogii* при снижении интенсивности света от 20 до 6  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  наблюдалось постепенное повышение  $C/X_l$  от 10-14 до 30-35, обусловленное

уменьшением внутриклеточной концентрации хлорофилла, содержание углерода на клетку при этом практически не изменялось. Фальковский и Овенс при работе с *Dunaliella tertiolecta* и *Skeletonema costatum* обнаружили, что при интенсивности света ниже  $20 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  клетки имели тенденцию к обесцвечиванию, одновременно с этим наблюдалось уменьшение размера и количества фотосинтетических единиц. Авторы регистрируют  $I = 20 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  как нижнюю границу светового диапазона, в пределах которого виды способны адаптироваться к меняющимся условиям освещения [86]. Уменьшение клеточной квоты хлорофилла в клетках *Thalassiosira pseudonana* при значениях освещенности ниже  $10 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  отмечено также в работе [181].

Считается, что критические для роста микроводорослей условия освещения составляют порядка  $8 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а в ряде случаев -  $4 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [52], по другим данным -  $17\text{-}34 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [50]. Неблагоприятное действие экстремально низкой освещенности проявляется в повышении значений отношения С/Хл, что, вероятно, обусловлено снижением скорости синтеза хлорофилла и частичным обесцвечиванием клеток. Водоросли при таком уровне освещения продолжают делиться с низкой скоростью, но увеличения содержания пигментов в клетках, компенсирующего изменения в световых условиях, не происходит.

#### **4.3 Влияние фотоадаптации на удельную скорость роста и отношение органического углерода к хлорофиллу *a* у диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum***

В отличие от «острых» экспериментов, например, измерение скорости фотосинтеза, при которых возможно определение «мгновенных» значений параметров сравниваемых культур, при исследовании ростовых характеристик водорослей неизбежен процесс адаптивных изменений, возникающих в процессе самой экспериментальной работы. Целесообразность проведения исследования,

результаты которого представлены в этом подразделе, определялась двумя важными задачами: 1) изучить влияние фотоадаптации на удельную скорость роста и отношение  $C/Xл$  у водорослей, предварительно адаптированных к разным световым условиям; 2) оценить особенности адаптации водорослей к свету высокой интенсивности, так как в литературе по морским водорослям практически нет работ такой тематики.

В ходе эксперимента водоросли, предварительно адаптированные к 17 и 225  $мкЭ \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$  – далее «тенивая» и «световая» культуры соответственно – переносили на световую решетку и выращивали при интенсивности света 16, 25, 50, 110, 430, 900 и 1250  $мкЭ \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$  (эксперимент № 3). Исходное состояние сравниваемых культур могло быть охарактеризовано лишь по двум параметрам – величине отношения  $C/Xл$  и скорости роста, которые соответствовали условиям предварительной адаптации водорослей. Перенос культур на свет разной интенсивности позволил определить такие величины, как начальный угол наклона  $\mu$ -I зависимости ( $\alpha$ ), максимальную скорость роста ( $\mu_{max}$ ), насыщающую интенсивность света ( $I_k$ ), а также степень устойчивости водорослей к экстремально высокой освещенности.

Световые зависимости удельной скорости роста «тенивой» и «световой» культур *P. tricornutum*, полученные на начальном и конечном этапе эксперимента (2 и 8 сутки) представлены на рисунке 4.5. После переноса водорослей на различные интенсивности света их удельная скорость роста изменялась соответственно новым условиям освещения. Значения скорости роста на 2 сутки эксперимента при лимитирующей освещенности не различались между двумя исследуемыми культурами. Начальный угол наклона кривых роста у свето- и тениадаптированной культур как на 2, так и на 8 сутки экспозиции составлял 0,024–0,025  $сут^{-1} \cdot (мкЭ \cdot м^{-2} \cdot с^{-1})^{-1}$  (таблица 4.3). При этом удельное содержание хлорофилла в клетках водорослей обеих культур не различалось.

Достоверных различий между значениями  $I_k$ , характеризующими начало светового насыщения световой кривой скорости роста, двух культур на протяжении всего эксперимента не наблюдалось.

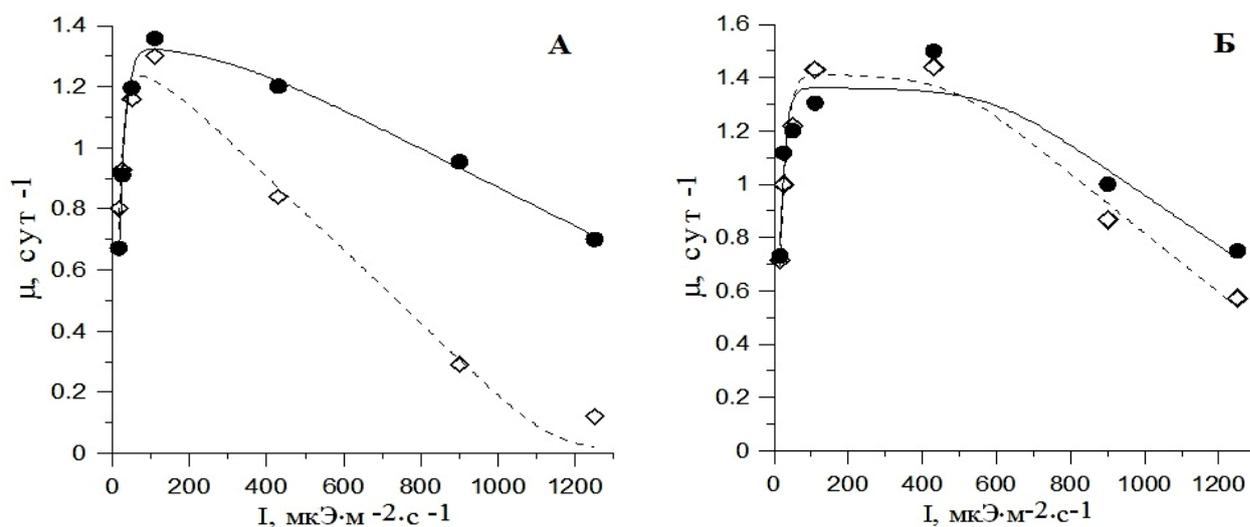


Рисунок 4.5 - Световые зависимости удельной скорости роста «световой» (—●—) и «теневой» (---◇---) культур *P. tricornutum*, полученные на 2 (А) и 8 (Б) сутки эксперимента. Точками на графиках обозначены измеренные значения, линиями – рассчитанные по уравнению (2.3) [95]

Таблица 4.3 - Основные параметры, описывающие зависимость удельной скорости роста *P. tricornutum* от световых условий

«Световая культура»					«Теневая культура»				
$\alpha$ , сут <sup>-1</sup> · (мкЭ·м <sup>-2</sup> · ·с <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>	$\mu_{\max}$ , сут <sup>-1</sup>	$I_k$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$I_t$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$I_b$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$\alpha$ , сут <sup>-1</sup> · (мкЭ·м <sup>-2</sup> · ·с <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>	$\mu_{\max}$ , сут <sup>-1</sup>	$I_k$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$I_t$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>	$I_b$ , мкЭ· м <sup>-2</sup> ·с <sup>-1</sup>
2 сутки эксперимента									
0,024	1,35	33	200	1300	0,025	1,3	30	110	615
8 сутки эксперимента									
0,025	1,4	35	620	1290	0,025	1,4	34	450	1200

Примечание:  $\alpha$  - начальный угол наклона  $\mu$ -I зависимости;  $\mu_{\max}$  - максимальная скорость роста;  $I_k$  - величина, характеризующая начало светового насыщения  $\mu$ -I зависимости;  $I_t$  - интенсивность света, выше которой наблюдается фотоингибирование роста водорослей;  $I_b$  – интенсивность света, при которой  $\mu$  составляет 37 % от  $\mu_{\max}$  в области высокой освещенности, характеризует степень фотоингибирования [149]

На начальном этапе экспозиции водоросли имели максимальную скорость роста в узком световом диапазоне – примерно от 30-33 до 200 и 110  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у свето- и тенеадаптированной культур соответственно. Однако по мере адаптации к новым световым условиям диапазон оптимальной для роста освещенности расширялся у обеих культур. Так, у водорослей, предварительно адаптированных к  $225 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , на 8 сутки экспозиции верхняя граница светового плато повысилась до  $600 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ . При более высокой освещенности отмечено снижение удельной скорости роста от 1,4 при  $600 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до 0,7 при  $1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

У тенеадаптированных водорослей на начальном этапе эксперимента при освещенности, превышающей  $110 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , наблюдалось более выраженное ингибирование скорости роста. Так, величина коэффициента  $I_b$  у «теневой» культуры составляла  $615 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  по сравнению с  $1300 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  у «световой» культуры. По мере адаптации к новым световым условиям скорость роста клеток повышалась и к концу эксперимента максимальный рост ( $1,4 \text{ сут}^{-1}$ ) наблюдался в световом диапазоне до  $450 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  (см. рисунок 4.5Б). Динамика удельной скорости роста тенеадаптированной культуры при различной освещенности представлена на рисунке 4.6.

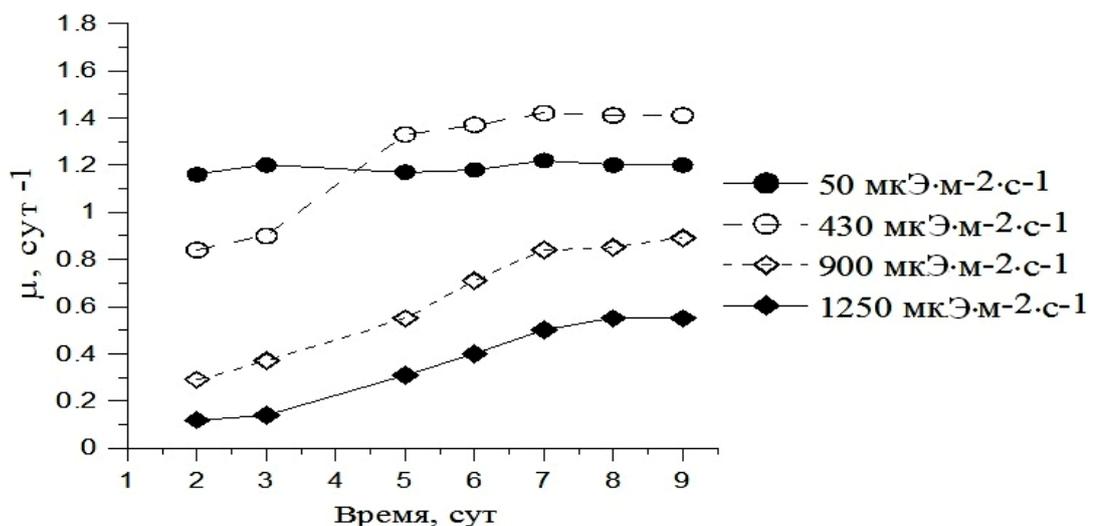


Рисунок 4.6 - Динамика удельной скорости роста «теневой» культуры *P. tricornutum* при экспозиции на различной интенсивности света

При интенсивности света  $50 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  культура сохраняла постоянную скорость роста ( $1,2 \text{ сут}^{-1}$ ) на протяжении всего эксперимента. При высокой освещенности 430, 900 и  $1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  скорость роста водорослей постепенно увеличивалась по мере адаптации к новым условиям освещения. При этом быстрый подъем значений  $\mu$  начинался после 3 суток экспозиции при этой освещенности. На 8 сутки эксперимента скорость роста достигала значений, наблюдаемых у светоадаптированной культуры, а величина  $I_b$  двух культур практически не различалась.

Выращивание водорослей при разных условиях освещения приводило также к изменению значений отношения  $C/X_{л}$  (рисунок 4.7). Светоадаптивные изменения концентрации хлорофилла у обеих культур в световом диапазоне от 16 до  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  завершались в течение 2 суток. При этом как у свето-, так и у тенеадаптированных водорослей отношение  $C/X_{л}$  изменялось от 25 при  $16 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до 75 при  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

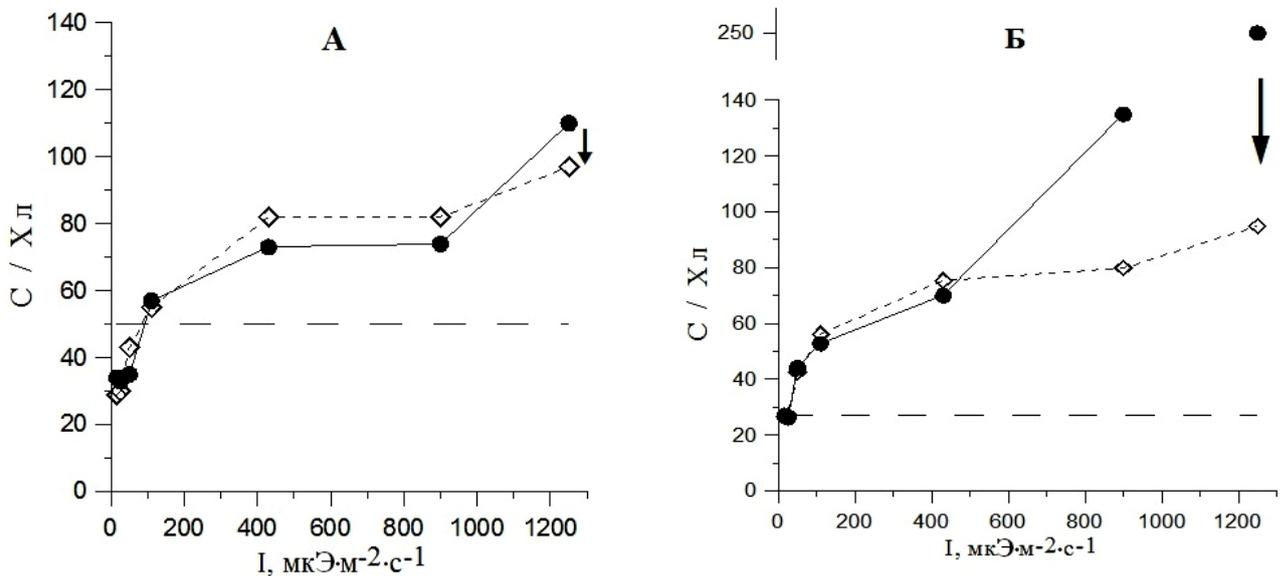


Рисунок 4.7 - Световые зависимости отношения  $C/X_{л}$  у «световой» (А) и «теневой» (Б) культур *P. tricornutum* на 2 (—●—) и 8 (---◇---) сутки эксперимента; пунктирной линией (— — —) обозначены исходные значения  $C/X_{л}$

При освещенности выше  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  водоросли, адаптированные к высокой и низкой интенсивности света, по-разному реагировали на изменение светового фактора. Так, у светоадаптированной культуры при освещенности 900 и  $1250 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  в течение 1-2 суток экспозиции отношение  $C/X_{л}$  повышалось от исходных 50 до 80-110 и сохранялось примерно на этом уровне в течение всего эксперимента (рисунок 4.7А). У тенеадаптированной культуры при освещенности, превышающей  $430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , на начальном этапе эксперимента наблюдалось повышение значений отношения  $C/X_{л}$  с максимумом на 2 сутки (рисунок 4.8), что коррелировало с ингибированием роста водорослей (см. рисунок 4.5). При дальнейшей экспозиции водорослей при этих условиях отношение  $C/X_{л}$  снижалось, одновременно с этим наблюдалось повышение скорости роста. Период восстановления функциональной активности клеток после светового ингибирования продолжался 3-4 суток.

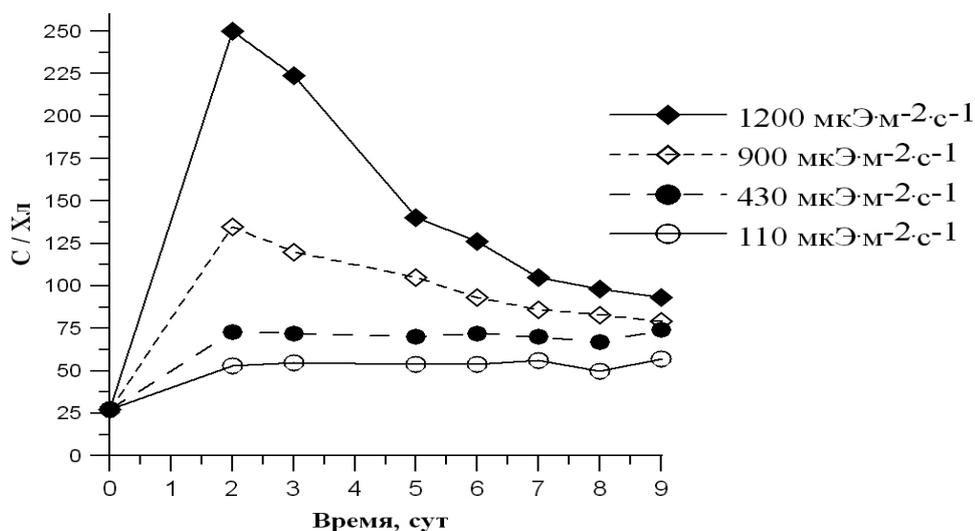


Рисунок 4.8 - Динамика отношения  $C/X_{л}$  «теневогой» культуры *P. tricornutum* при высокой интенсивности света

Считается, что для адаптации к новым условиям освещения водоросли должны осуществить как минимум два клеточных деления [5]. Результаты наших экспериментов показали, что в диапазоне освещенности  $16-430 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  как при переносе водорослей с низкого света на высокий, так и наоборот,

светоадаптивные изменения скорости роста и концентрации хлорофилла в клетках завершались в течение 2 суток и не зависели от световых условий адаптации. За указанный временной интервал водоросли совершали 2-4 деления.

Время адаптация водорослей к экстремально высокой освещенности 900 и 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  зависело от предварительных световых условий роста культуры. Светоадаптированные водоросли характеризовались большей устойчивостью к повреждающему действию ингибирующих значений светового фактора. Так, при переносе культуры с 225 на 900 и 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  адаптация водорослей к новым условиям освещения завершалась в течение 2 суток. В то время как перенос водорослей с 17 на 900 и 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  на некоторое время приводил к полной остановке роста водорослей, снижению их функциональной активности и резкому уменьшению содержания хлорофилла в клетках, обусловленному, вероятно, фотоиндуцируемым разрушением пигмента под действием света высокой интенсивности. Так, в работе [36] авторы полагают, что фотосинтетический пигмент способен поглотить определенное количество квантов света (летальная доза), после чего разрушается. В нашем эксперименте на 3-5 сутки экспозиции в условиях экстремально высокой освещенности (900 и 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ) рост водорослей возобновлялся, достигая максимальных значений на 7 сутки. Восстановление функциональной активности водорослей сопровождалось возобновлением синтеза хлорофилла в клетках, что в свою очередь отражалось в постепенном снижении значений отношения С/Хл. На 7 сутки экспозиции внутриклеточное отношение С/Хл стабилизировалось, что свидетельствовало о завершении адаптации водорослей к новым условиям освещения. В ряде экспериментальных исследований показано, что изменение содержания хлорофилла в клетке при переносе водорослей с низкого света на высокий в большей мере контролируется изменением скорости синтеза пигмента во вновь образованных клетках, а не быстрой деградацией хлорофилла [21, 58, 151]. Результаты нашего исследования демонстрируют способность водорослей адаптироваться к экстремально меняющимся условиям освещения и сохранять функциональную активность даже при крайне высоких значениях освещенности.

В свою очередь временной интервал, необходимый для адаптации к новым световым условиям определяется скоростью роста водорослей.

\* \* \*

Таким образом, полученные результаты показали: 1. Начальный угол наклона  $\mu$ -I зависимости и максимальная скорость роста достоверно не различались для водорослей, предварительно адаптированных к низкой и высокой интенсивности света. 2. Временной интервал, необходимый для полной адаптации клеток к новым условиям освещения, занимал от 2 до 6 суток в зависимости от интенсивности света. 3. При освещённости от 16 до 430  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  светоадаптивные изменения концентрации хлорофилла завершались в течение 2 суток и не зависели от световых условий адаптации. 4. Тене- и светоадаптированные водоросли характеризовались разной степенью устойчивости к действию света высокой интенсивности (выше 430  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ). У тенеадаптированных водорослей в течение 1–2 суток отмечалось фотоингибирование роста и повышение отношения С/Хл. Процесс восстановления функциональной активности клеток и снижение отношения С/Хл завершались в течение примерно 5–6 суток. У светоадаптированных водорослей наблюдалась большая устойчивость ростовых показателей и отношения С/Хл к действию света высокой интенсивности. 5. Выявлен обратимый характер светового ингибирования, что свидетельствует о способности клеток сохранять высокую функциональную активность даже при крайне высоких значениях освещённости.

## ГЛАВА 5 СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА И СТЕПЕНИ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ АЗОТОМ НА СКОРОСТЬ РОСТА И ОТНОШЕНИЕ C/Xл *a* У ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ (НА ПРИМЕРЕ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*)

### 5.1 Динамика внутриклеточного содержания углерода, азота и хлорофилла в условиях накопительного роста водорослей при разной интенсивности света

В процессе накопительного роста культуры *P. tricornutum* отмечены все стадии обеспеченности микроводорослей азотом. На экспоненциальном участке накопительной кривой роста, когда клетки находились в условиях полной биогенной обеспеченности, водоросли характеризовались максимальной скоростью роста и постоянством отношения C/Xл (соответственно световым условиям). При этом внутриклеточное отношение углерода к азоту (C/N) также оставалось постоянным и поддерживалось на уровне 5-6 (рисунок 5.1). Считается, что такое соотношение между углеродом и азотом в клетках морских микроводорослей оптимально и соответствует условиям полной обеспеченности азотом [101, 163]. При увеличении плотности культуры концентрация минерального азота (в нитратной форме) в среде снижалась, что приводило к замедлению роста водорослей и повышению внутриклеточных отношений C/N и C/Xл.

Отношение C/N в клетках *P. tricornutum*, как при низкой, так и при высокой интенсивности света начинало возрастать при снижении содержания азота в среде ниже ~10 мкМ (рисунок 5.2). Дальнейший рост биомассы микроводорослей происходил уже в условиях отсутствия азота в среде, но на фоне постепенного снижения его удельной внутриклеточной концентрации. Более чем двукратное снижение содержания азота в клетках (C/N изменялось от 5-6 до 14)

соответствовало увеличению плотности культуры примерно в 2 раза (по углероду).

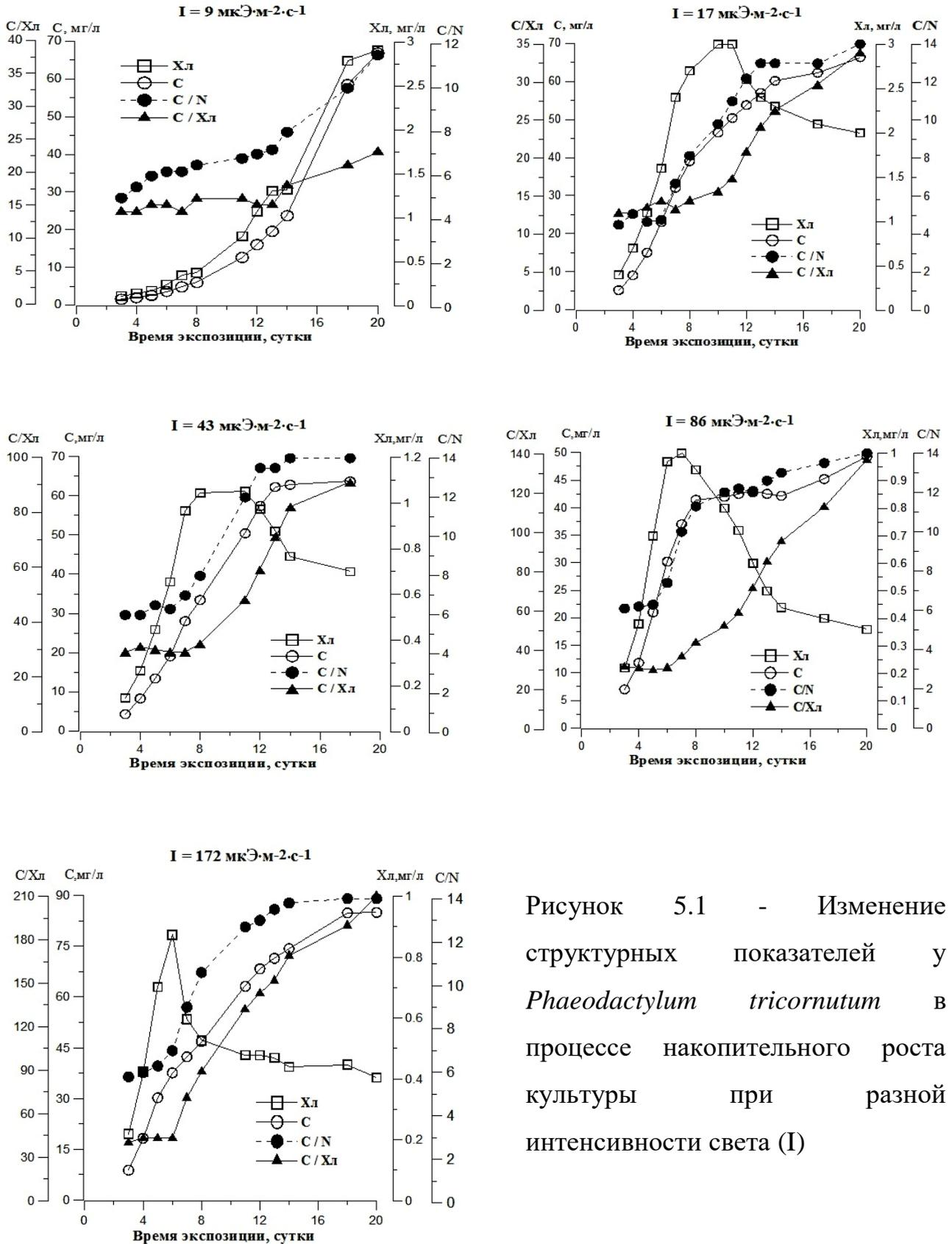


Рисунок 5.1 - Изменение структурных показателей у *Phaeodactylum tricornutum* в процессе накопительного роста культуры при разной интенсивности света (I)

Таким образом, после исчерпания запасов азота в среде рост водорослей еще некоторое время продолжается за счет внутреннего азотного пула. Ранее было установлено, что процесс роста биомассы клеточных популяций состоит из трех стадий: 1) поглощение питательных веществ клетками из среды без увеличения численности водорослей; 2) деление клеток при одновременном потреблении вещества из среды; 3) деление клеток без потребления веществ из среды, т.е. за счет внутренних запасов питательного вещества [17]. Аналогичные стадии развития накопительных культур приняты за основу при разработке концепции потребностей фитопланктона в биогенных элементах [16].

Наши эксперименты показали, что минимальное удельное содержание азота в клетке ( $C/N = 14$ ) не зависит от интенсивности света и начальной концентрации биогенного элемента в среде. Подобные результаты были получены Артюховой с соавторами для четырех видов зеленых водорослей [2].

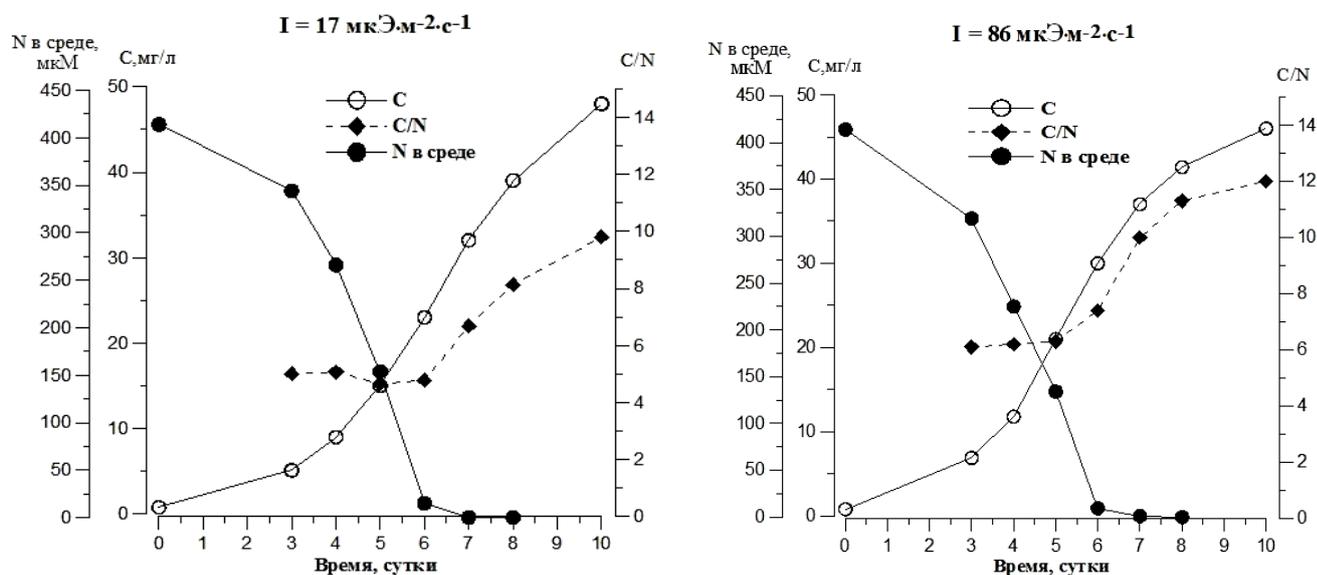


Рисунок 5.2 - Динамика плотности культуры, содержания азота (нитратная форма) в среде и отношения  $C/N$  у *Phaeodactylum tricornutum* в процессе накопительного роста культуры

При повышении  $C/N$  в клетках наблюдалось и увеличение отношения  $C/X_{\text{л}}$ . Зависимость  $C/X_{\text{л}}$  от  $C/N$  имела экспоненциальный вид:  $C/X_{\text{л}} = b \cdot \exp^{k \cdot C/N}$ , а

диапазон вариабельности величины  $C/X_{л}$  определялся условиями освещения (рисунок 5.3). При минимальной в эксперименте интенсивности света  $9 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  рост  $C/N$  от 5 до 12 слабо сказывался на изменении отношения  $C/X_{л}$ , его значение возрастало от 14 до 23. В то же время при высокой интенсивности света  $172 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$   $C/X_{л}$ -отношение увеличивалось от 40 до 210 при повышении  $C/N$  от 6 до 14. Очевидно, это обусловлено характером изменения содержания хлорофилла у водорослей при разной освещенности (см. рисунок 5.1). Так, концентрация пигмента в клетке определяется соотношением между скоростью его синтеза и скоростью разрушения в процессе фотоокисления. При этом наличие азота - необходимое условие для образования хлорофилла, его дефицит приводит к подавлению синтеза пигмента и обуславливает целый ряд изменений в фотосинтетическом аппарате и метаболизме водорослей [84]. В то же время в клетке происходит фотоокисление антенного хлорофилла, интенсивность которого усиливается по мере увеличения плотности светового потока [110, 133]. Кроме того имеются данные о целенаправленном разрушении пигмент-белковых комплексов у микроводорослей для высвобождения азота. В частности, на примере пресноводной зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* показано, что при истощении внешнего источника и внутренних запасов биогена водоросли получают азот за счёт катаболизма молекул хлорофилла и тратят его на увеличение численности своей популяции и на поддержание высокой эффективности фотосинтеза [15].

Таким образом, при повышении освещенности наблюдается прогрессирующее снижение содержания пигмента в клетках, обусловленное как адаптивными перестройками фотосинтетического аппарата водорослей в результате фотоокислительного стресса, так и снижением его синтеза из-за недостатка азота. Это отражается в увеличении степенного коэффициента экспоненциальной зависимости отношения  $C/X_{л}$  от  $C/N$ , величина которого изменялась от 0,083 при  $9 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до 0,182 при освещенности  $172 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ .

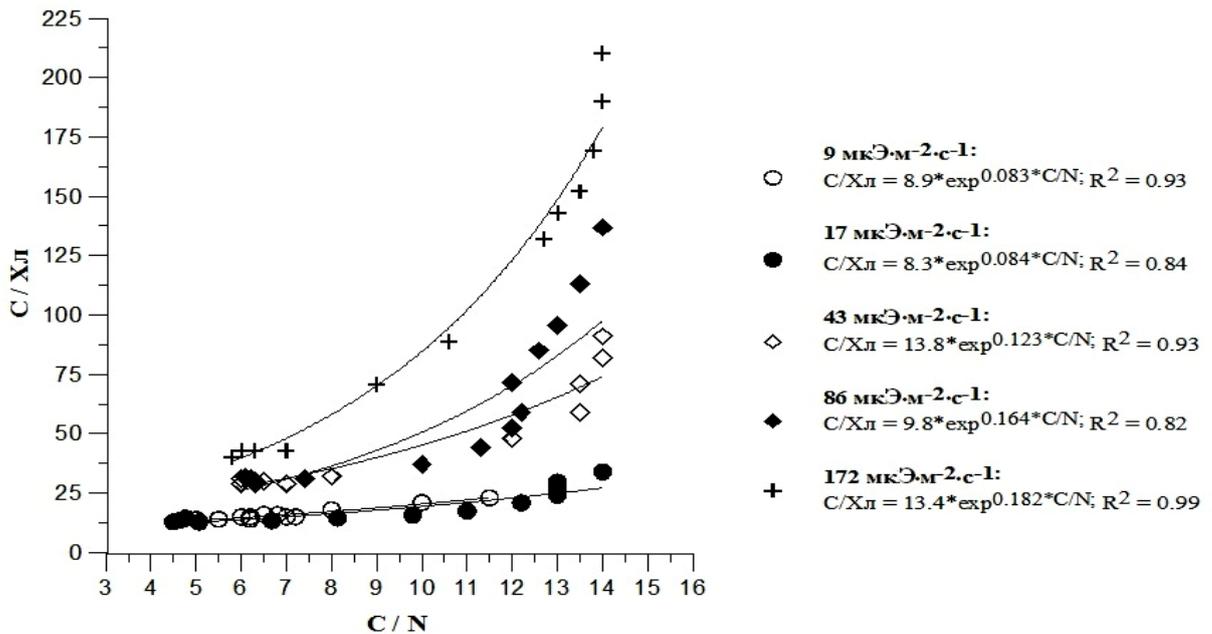


Рисунок 5.3 - Зависимость отношения C/Xл от C/N в клетках *Phaeodactylum tricornutum* при разной освещенности

Выявленные закономерности изменения внутриклеточных квот хлорофилла и азота, вероятно, характерны для большинства видов микроводорослей, так как в основе изменений лежат физиологические механизмы, присущие всем фотосинтезирующим организмам. Количественные же показатели в этих зависимостях будут различаться для разных представителей фитопланктона, отражая видоспецифичность адаптации водорослей к уровню освещенности и условиям минерального питания. Например, у диатомовой водоросли *Thalassiosira fluviatilis* при освещенности 240 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> изменение C/N от 10 до 19 приводило к повышению C/Xл в клетках от 60 до 330 [125]. У другого представителя диатомей *Skeletonema costatum* в диапазоне изменения C/N 7–18 величина C/Xл в клетках повышалась от 48 до 130 при интенсивности света 100 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>, а при 1200 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> отношение возрастало от 112 до 370 [162].

По результатам исследования нами установлена зависимость между удельной скоростью роста клеток *P. tricornutum* и содержанием азота в них при разных световых условиях культивирования (рисунок 5.4). При интенсивности

света  $17\text{--}172 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  зависимость скорости роста ( $\mu$ ) от  $C/N$  описывается уравнением Друпа [78]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{1 - C/N_{\max}/C/N}{1 - C/N_{\max}/C/N_{\min}}, \quad (5.1)$$

где  $\mu_{\max}$  – максимальная скорость роста, не ограниченная концентрацией субстрата;

$C/N$  – удельное содержание азота в клетке (в расчете на углерод);

$C/N_{\max}$  – минимальное удельное содержание азота в клетке;

$C/N_{\min}$  – максимальное удельное содержание азота в клетке.

У *P. tricornutum* максимальная удельная скорость роста при температуре  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  составляла  $0,7 \text{ сут}^{-1}$ , минимальное содержание азота в клетке соответствовало отношению  $C/N = 14$ , а максимальное -  $C/N = 5$ .

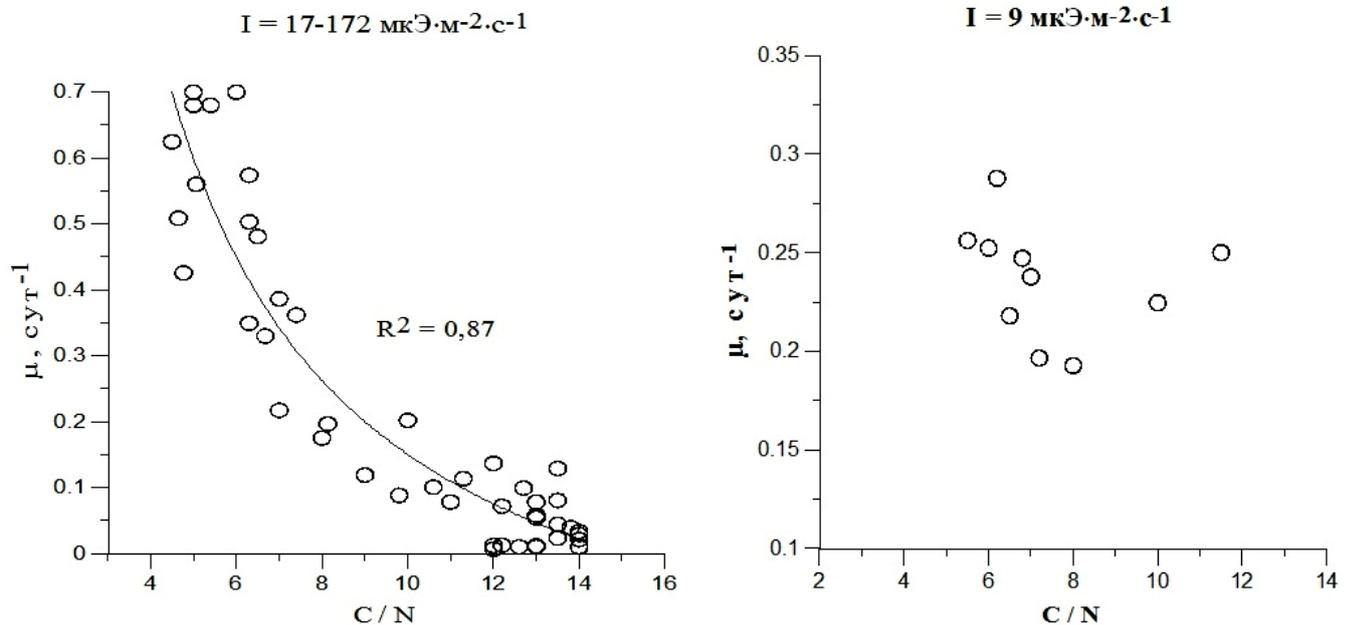


Рисунок 5.4 - Зависимость удельной скорости роста *Phaeodactylum tricornutum* от внутриклеточного отношения  $C/N$  при разной интенсивности света. Точками на графиках обозначены экспериментальные данные, линией – их математическое описание уравнением (5.1)

При низкой освещенности  $9 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  в эксперименте мы не наблюдали подобной взаимосвязи между удельной скоростью роста и внутриклеточным отношением  $C/N$ . При изменении  $C/N$  от 5 до 12 значения  $\mu$  изменялись в пределах  $0,2\text{--}0,3 \text{ сут}^{-1}$  (см. рисунок 5.4). По-видимому, это связано с сильной световой лимитацией на всех стадиях роста культуры. Освещенность  $9 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  соответствует области светового лимитирования с преобладанием фотохимических реакций в процессе фотосинтеза, и результаты показывают, что ростовые характеристики водорослей в данных условиях в большей степени отражают влияние света, чем недостатка минерального питания.

Планктонные водоросли, хотя и отличаются многообразием форм и пигментного состава, но проявляют общие закономерности адаптации к условиям среды. Зависимости, описываемые моделью Друпа [78], общепризнанны. Минимальное внутриклеточное отношение углерода к азоту ( $C/N_{\min}$ ), наблюдаемое в условиях обеспеченности водорослей минеральным питанием для большинства видов, как отмечено выше, составляет от 5 до 7 [163]. В то же время максимальное отношение  $C/N$  в клетках ( $C/N_{\max}$ ) – видоспецифичный параметр, отражающий разную способность водорослей адаптироваться к условиям азотного лимитирования, и является своего рода индикатором конкурентоспособности видов в определенных условиях обеспеченности клеток минеральным питанием [94, 129]. В частности, высокие значения  $C/N_{\max}$  демонстрируют высокую лабильность внутриклеточного азотного пула и способность водорослей расти даже в крайне неблагоприятных по минеральному питанию условиях. Основываясь на анализе литературных данных среднее значение  $C/N_{\max}$  для диатомовых водорослей составляет порядка 15 (диапазон изменения между видами – от 14 до 50), для динофитовых – 22 (20–25), для зеленых – 34, максимальные значения описываемого параметра зарегистрированы у кокколитофорид – 45 [129]. Полученное в наших экспериментах с *P. tricornutum*  $C/N_{\max} = 14$  соизмеримо с минимальными значениями этого параметра, приводимыми в литературе, что свидетельствует о высокой чувствительности вида к недостатку азота в среде.

\* \* \*

Таким образом, изменение внутриклеточного отношения C/N у *P. tricornutum* наблюдалось при снижении концентрации азота в среде ниже 10 мкМ. При исчерпании азота в среде рост водорослей некоторое время продолжался за счет внутриклеточного запаса этого элемента, что обеспечивало увеличение биомассы водорослей по углероду приблизительно в 2 раза. В процессе накопительного роста *P. tricornutum* отношение C/N в клетках изменялось от 5 до 14. Величина минимальной клеточной квоты азота не зависела от световых условий выращивания. В условиях светового лимитирования скорость роста микроводоросли определялась интенсивностью освещения и слабо зависела от степени обеспеченности клеток азотом. При световом насыщении, наоборот, наблюдалась выраженная зависимость скорости роста от внутриклеточного отношения C/N. Полученная зависимость описана уравнением Друпа и не изменялась при интенсивности света от 17 до 172 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Отношение C/Хл экспоненциально возрастало при повышении C/N в клетке. Влияние дефицита азота на величину C/Хл усиливалось при повышении интенсивности света, что, вероятно, обусловлено усилением фотодеструкции хлорофилла при повышении плотности светового потока, которая происходит на фоне снижения скорости синтеза пигмента из-за недостатка азота.

## **5.2 Влияние температуры на C/N и C/Хл а отношения в клетках водорослей при разной освещенности**

Результаты эксперимента показали, что изменение температуры культивирования не влияло на форму связи между содержанием хлорофилла и азота в клетках водорослей (рисунок 5.5). Зависимость C/Хл от C/N, как отмечено выше, имела экспоненциальный вид, а диапазон варибельности величины C/Хл регулировался условиями освещения.

При интенсивности света 43 и 172 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> кривые зависимости С/Хл от С/Ν, полученные при 10 и 20 °С, изменялись идентично, а величины степенных коэффициентов, отражающие угол наклона кривых, отличались незначительно (рисунок 5.5). При этом абсолютные значения С/Хл при 10 °С были в 1,4-1,6 раза выше величины отношения при 20 °С.

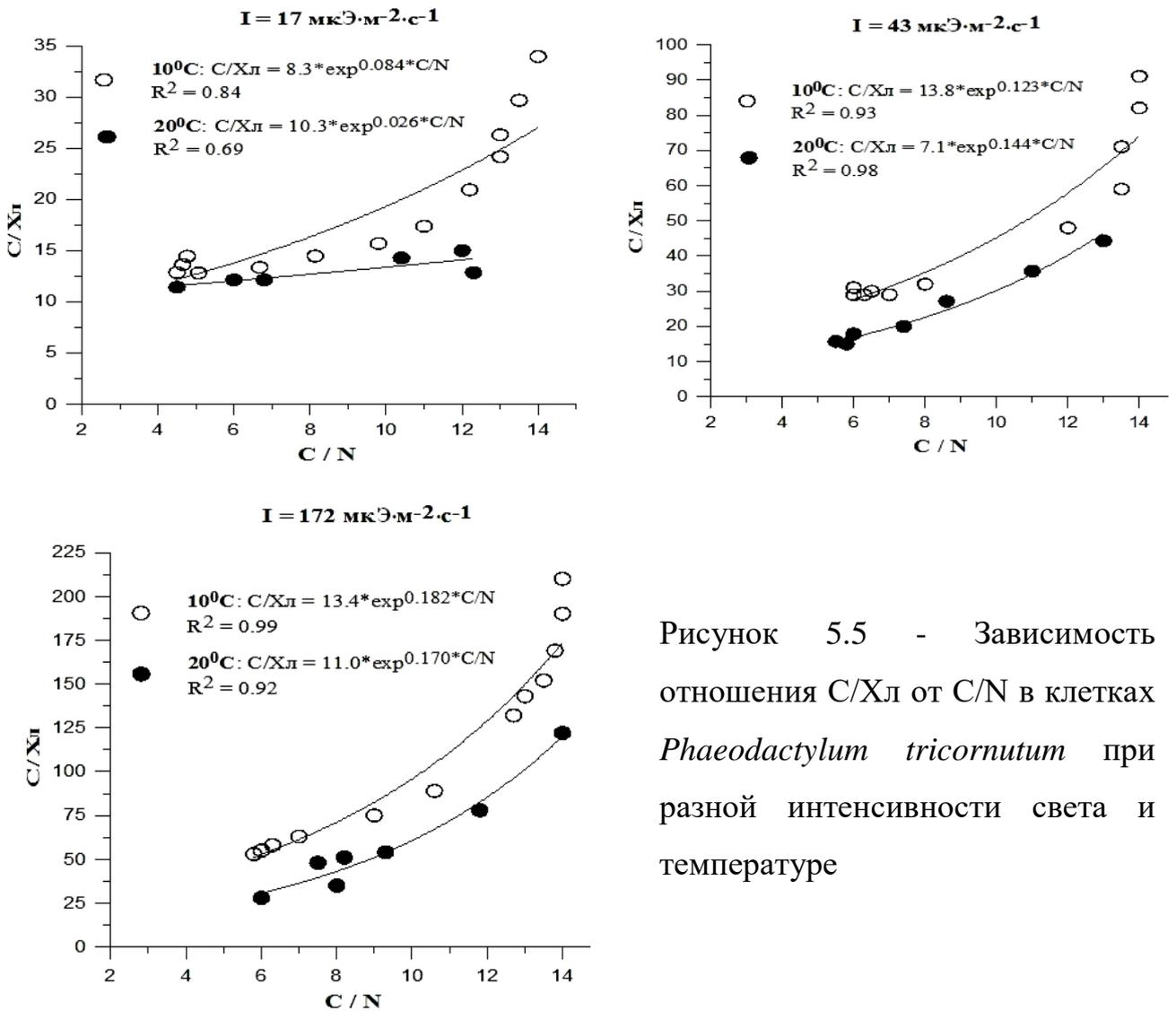


Рисунок 5.5 - Зависимость отношения С/Хл от С/Ν в клетках *Phaeodactylum tricornutum* при разной интенсивности света и температуре

Иной результат был получен при интенсивности света 17 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> - при температуре 10 °С отношение С/Хл экспоненциально повышалось от 13 до 35 при изменении С/Ν от 5 до 14, в то время как при температуре 20 °С зависимость С/Хл от С/Ν была выражена слабо. Очевидно, это объясняется тем, что при 20 °С освещенность 17 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> еще являлась лимитирующей для роста микроводорослей, а при 10 °С – уже была близка к насыщающей.

Изменение температурных условий культивирования *P. tricornutum* приводило к изменению максимальной удельной скорости роста водорослей, величина которой при 10 °С составляла 0,7 сут<sup>-1</sup>, а при 20 °С повышалась до 1,5 сут<sup>-1</sup>. В то же время форма зависимости  $\mu$  от C/N не изменялась от температуры и описывалась уравнением (5.1) (рисунок 5.6А). Величина  $\mu$  сама по себе без нормировки на  $\mu_{\max}$  не дает информации о степени азотного лимитирования клеток, а сравнение зависимостей, полученных при разной температуре, показывает, что одному значению C/N соответствуют разные величины скорости роста. Известно, что удельная скорость роста водорослей зависит от различных факторов среды, но не может превышать некоторого видоспецифичного максимального значения  $\mu_{\max}$ , поэтому для сравнительной оценки целесообразно использовать нормированную относительно этого значения скорость роста ( $\mu/\mu_{\max}$ ). При применении в наших расчетах относительной скорости роста, отражающей процент обеспеченности клеток азотом, влияние температурного фактора нивелировалось, а значения, полученные при 10 и 20 °С, достоверно не различались (рисунок 5.6Б).

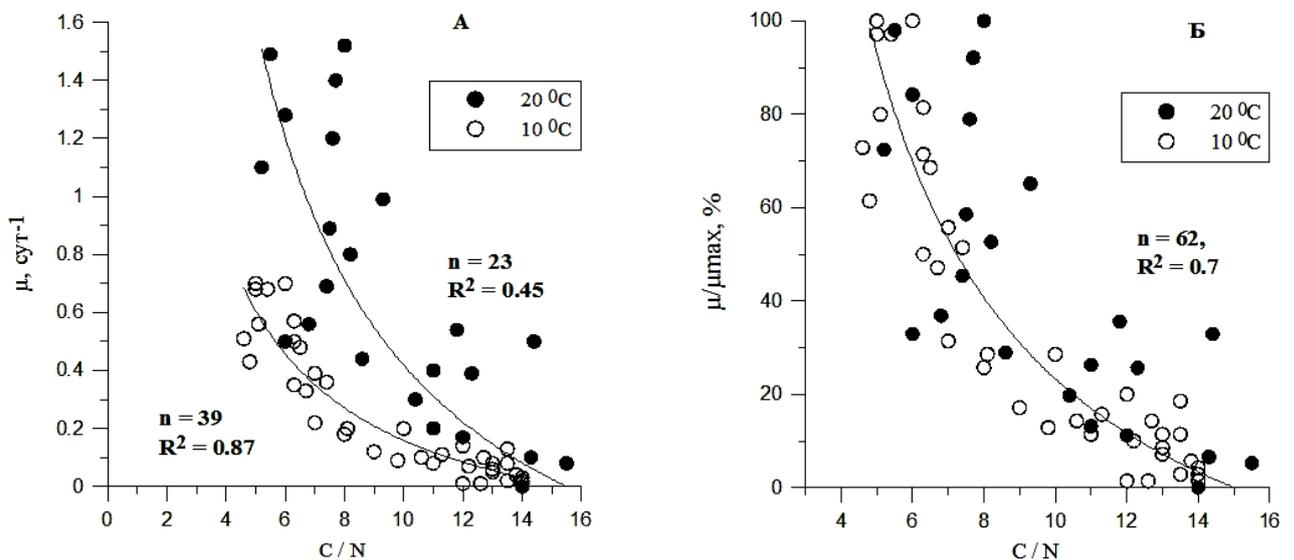


Рисунок 5.6 - Влияние температуры на зависимость удельной (А) и относительной (Б) скорости роста *Phaeodactylum tricornutum* от внутриклеточного отношения C/N при интенсивности света 17-172 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>

Таким образом, уровень обеспеченности клеток азотом и температура выступают как два не зависящих друг от друга фактора, и их совместное действие на изменение скорости роста водорослей носит аддитивный характер. В частности, температура определяет величину максимальной скорости роста водорослей в условиях полной обеспеченности минеральным питанием. В свою очередь снижение степени обеспеченности клеток азотом проявляется в уменьшении скорости роста ниже максимального значения в заданных световых и температурных условиях.

В уравнении (5.1), описывающем зависимость  $\mu$  от  $C/N$ , влияние температуры выражается через температурно-зависимое изменение величины  $\mu_{\max}$ . Замена удельной скорости роста ( $\mu$ ) на относительную ( $\mu/\mu_{\max}$ ) позволяет количественно выразить связь между степенью обеспеченности водорослей азотом (в процентах) и внутриклеточным отношением  $C/N$  (уравнение 5.2). В основе же остается принцип, что при  $C/N_{\min}$  (для *P. tricornutum* = 5) водоросли находятся в условиях 100 %-й обеспеченности биогенным элементом, а  $C/N_{\max}$  в клетках (для *P. tricornutum* = 14) соответствует условиям «острого» азотного дефицита – прекращение роста, обеспеченность азотом 0 %.

$$\mu/\mu_{\max} = \frac{1 - C/N_{\max}/C/N}{1 - C/N_{\max}/C/N_{\min}} \cdot 100 \%, \quad (5.2)$$

По результатам исследования установлено, что минимальное и максимальное отношение  $C/N$  в клетках *P. tricornutum* (максимальная и минимальная клеточная квота азота соответственно) не зависели от температуры культивирования. В то же время в ряде исследований показано, что в условиях полной обеспеченности водорослей минеральным питанием внутриклеточное отношение углерода к азоту у большинства видов изменяется при разной температуре, при этом форма зависимости  $C/N_{\min}$  от температуры видоспецифична [131, 173, 180]. Так, в экспериментальной работе [180] показано, что у диатомеи *Thalassiosira pseudonana* и динофитовой водоросли *Pavlova lutheri*

наблюдается линейное повышение внутриклеточного отношения углерода к азоту с ростом температуры в диапазоне 10-25 °С. У видов *Chaetoceros calcitrans*, *C. simplex*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* в том же диапазоне температур форма зависимости имеет куполообразный вид с максимумом при 15-20 °С. Однако у *Chaetoceros gracilis* и *P. tricornutum* отношение C/N в клетках не зависело от температуры, что согласуется с результатами нашего исследования. В работе [131] авторы отмечают независимость отношения C/N от температуры выращивания у *Chaetoceros sp.* и *Prorocentrum minimum*, в то время как у двух других исследуемых ими видов - *Thalassiosira weissflogii* и *Gyrodinium uncatenum* – такая зависимость наблюдается. В исследовании [173] авторы на примере диатомовой водоросли *Thalassiosira pseudonana* показали, что в условиях обеспеченности клеток минеральным питанием повышение температуры культивирования приводит к снижению внутриклеточных концентраций азота и углерода. При этом азот более подвержен влиянию температуры, чем углерод - при изменении температуры от 7 до 25 °С содержание N и C в клетке снижается на 35 и 15 % соответственно. В результате чего отношение C/N линейно возрастает от 8 при 7 °С до 11 при 25 °С.

В экспериментальной работе [157] на примере зеленой микроводоросли *Scenedesmus sp.* показано, что в условиях дефицита минерального питания, при котором поддерживаются все основные биохимические и физиологические процессы водорослей (клетка уже не делится, но и не погибает),  $C/N_{\max}$  повышается почти в 2 раза при изменении температуры от 11 до 20 °С. Объясняется это тем, что для продуцирования одного и того же количества органического вещества при низкой температуре клеткам требуется больше азота, чем при высокой (оптимальной) температуре. Тем не менее, в нашем исследовании зависимости  $C/N_{\max}$  от температуры в диапазоне 10-20 °С у *P. tricornutum* не наблюдалось, что обусловлено пропорциональным изменением внутриклеточных концентраций углерода и азота при изменении температуры культивирования.

Очевидно, что изменение отношения C/N в зависимости от температуры (при постоянстве других факторов) обусловлено характером изменения внутриклеточной концентрации азота. Сравнение собственных и литературных данных демонстрирует отсутствие единой закономерности, описывающей связь между C/N в клетках микроводорослей и температурой – у ряда видов такой зависимости не наблюдается, у других отмечается повышение величины отношения при увеличении температуры, в то же время сама форма связи может иметь линейный или куполообразный вид. Для более подробного изучения этого вопроса необходимо проведение дополнительного детального исследования.

\* \* \*

Таким образом, совместное действие температуры и степени обеспеченности азотом на изменение скорости роста и внутриклеточного отношения углерода к хлорофиллу у *P. tricornutum* носит аддитивный характер. Температура определяет величину максимальной скорости роста и отношения C/Хл в условиях полной обеспеченности клеток азотом. В то же время форма связи и коэффициенты уравнений, описывающих изменение скорости роста и внутриклеточного содержания хлорофилла в зависимости от степени обеспеченности клеток азотом (C/N), не зависят от температуры, а определяются световыми условиями роста водорослей.

### **5.3 Закономерности изменения удельной скорости роста и содержания хлорофилла *a* у *Phaeodactylum tricornutum* в зависимости от концентрации азота в питательной среде и световых условий культивирования**

Большинство экспериментальных исследований, посвященных выявлению отклика водорослей на изменение условий минерального питания, направлено на изучение физиологических характеристик водорослей при дефиците азота. Это оправдано, так как в большинстве районов Мирового океана первичную

продукцию лимитирует именно недостаток минерального азота [77, 104]. Однако немаловажным для понимания физиологических процессов в клетках является исследование изменения структурно-функциональных показателей водорослей при концентрации биогенных элементов еще не являющейся лимитирующей, но изменяющейся в широких пределах. При этом возможно взаимодействие между уровнем биогенной обеспеченности клеток и световыми условиями их роста, так как скорость потребления биогенных элементов из среды зависит от многих внешних факторов, включая интенсивность света [126, 146].

В представленной работе проведена оценка изменения удельной скорости роста и концентрации хлорофилла в клетках водорослей в зависимости от исходной концентрации азота в среде и световых условий культивирования в широком диапазоне изменения каждого из указанных факторов. В разных вариантах опыта исходное содержание азота (в нитратной форме) в питательной среде (далее Нисх.) составляло 414, 167, 83, 46, 23, 14 и 10 мкМ, интенсивность света варьировала от 14 до 1200 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (эксперимент № 5).

Результаты исследования показали, что влияние исходной концентрации азота в среде на структурно-функциональные характеристики водорослей не одинаково в широком диапазоне изменения интенсивности света. Так, при освещенности 14-150 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> снижение Нисх. в среде от 414 до 10 мкМ не влияло на скорость роста *P. tricornutum* (рисунок 5.7). Эффективность роста водорослей, рассчитанная из уравнения (2.3) и количественно равная тангенсу начального угла наклона  $\mu$ -I зависимости, во всех вариантах эксперимента не изменялась и составляла в среднем  $0,028 \pm 0,007$  сут<sup>-1</sup>·(мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>. Максимальная удельная скорость роста *P. tricornutum* была равна  $1,3 \pm 0,1$  сут<sup>-1</sup>.

В то же время при интенсивности света выше 150 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> снижение исходной концентрации азота в среде от 414 до 10 мкМ приводило к сужению диапазона оптимальной для роста водорослей интенсивности света и более раннему световому ингибированию их скорости роста: верхняя граница светового плато  $\mu$ -I зависимости ( $I_t$ ) снижалась от 900 до 150 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (рисунок 5.8А), а

коэффициент  $I_b$ , отражающий степень фотоингибирования скорости роста, изменялся от 1700 до 580  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  (рисунок 5.8Б).

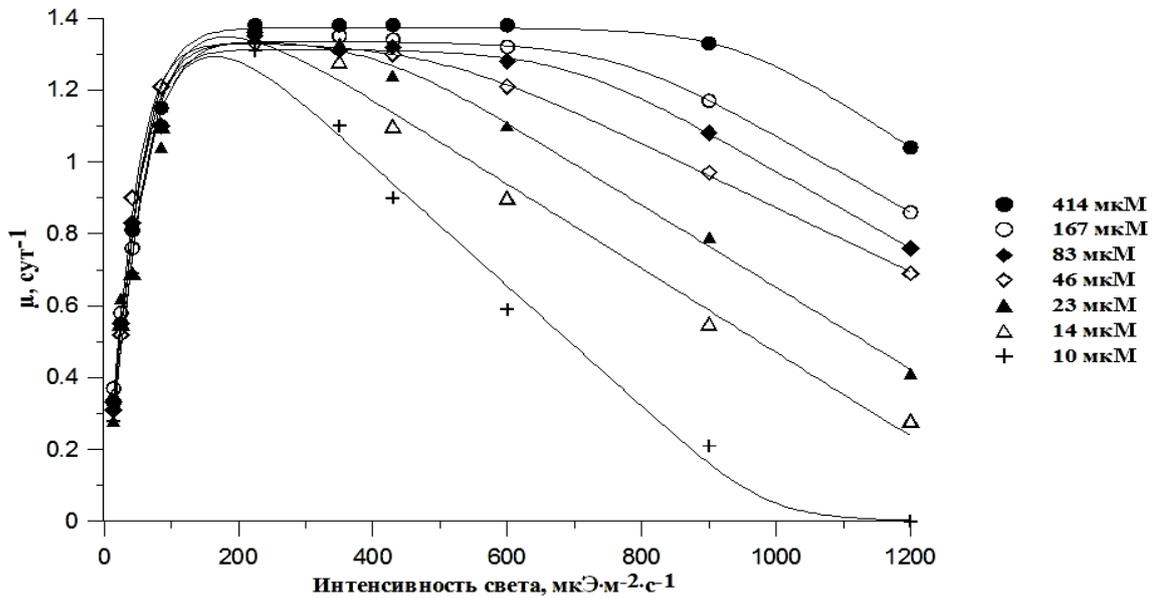


Рисунок 5.7 - Изменение световой кривой удельной скорости роста *P. tricornutum* в зависимости от исходной концентрации азота (в нитратной форме) в питательной среде

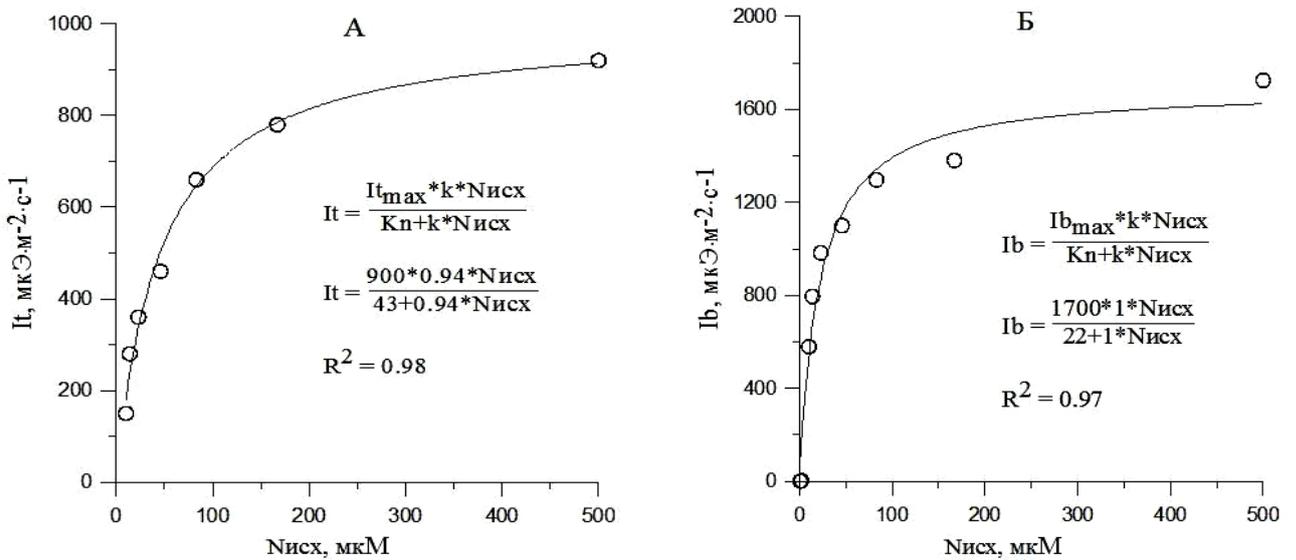


Рисунок 5.8 – Изменение верхней границы светового плато  $I_t$  (А) и коэффициента степени светового ингибирования  $I_b$  (Б) у *P. tricornutum* в зависимости от исходной концентрации азота (в нитратной форме) в среде

Как видно из представленных графиков обе зависимости ( $I_t$  от  $N_{исх.}$  и  $I_b$  от  $N_{исх.}$ ) описываются гиперболической кривой с несколькими коэффициентами:  $I_{t_{max}}$  и  $I_{b_{max}}$  – максимальные значения  $I_t$  и  $I_b$ , наблюдаемые при высокой концентрации азота в среде;  $k$  – начальный угол наклона зависимости;  $K_n$  – значение  $N_{исх.}$ , при котором величины  $I_t$  и  $I_b$  составляют половину от их максимальных значений, т.е. коэффициент  $K_n$  является своего рода аналогом константы полунасыщения в уравнении субстратзависимого роста Моно [141].

В световом диапазоне от 150 до 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  при каждой из исследуемых освещенностей зависимость удельной скорости роста от концентрации азота в среде с высокой точностью описывается уравнением Моно [141] (рисунок 5.9А). При этом константа полунасыщения, численно равная концентрации субстрата, при которой удельная скорость роста водорослей принимает значение половины от максимальной, возрастает от 1,8  $\text{мкМ}$  при 350  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до 46  $\text{мкМ}$  при 1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  по степенной зависимости (рисунок 5.9Б).

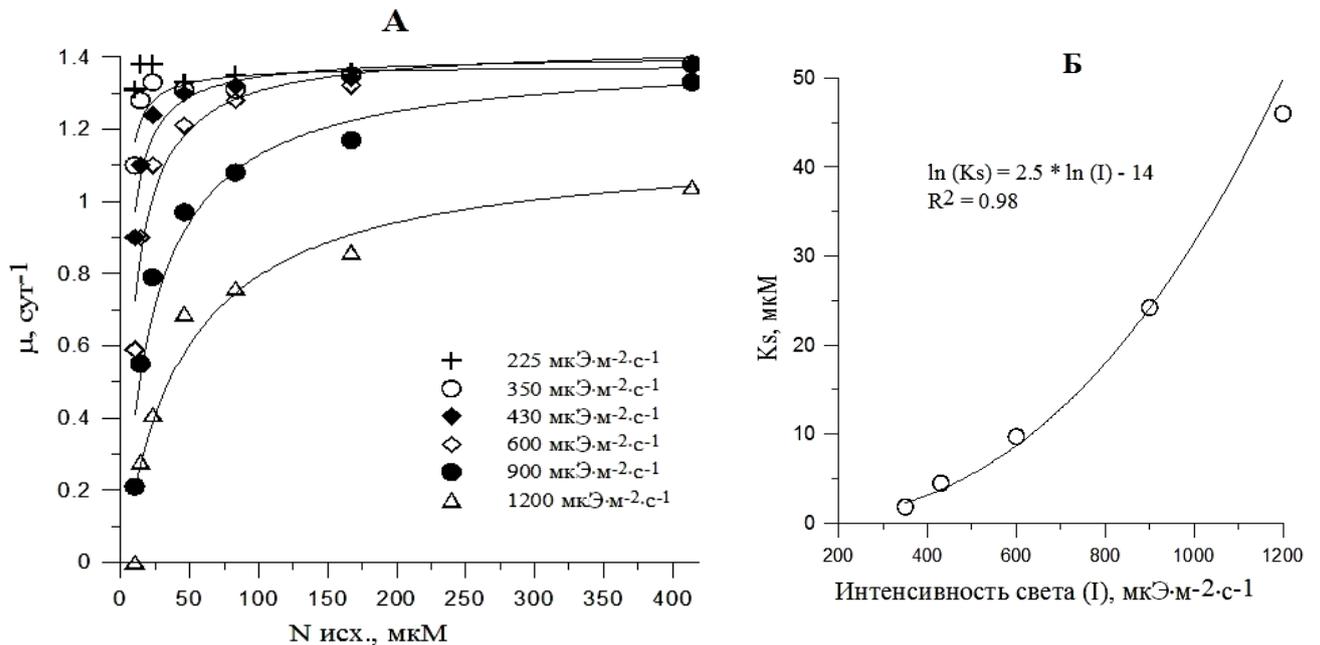


Рисунок 5.9 – Зависимость удельной скорости роста водорослей от  $N_{исх.}$  в диапазоне освещенности 225-1200  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  (А); зависимость константы полунасыщения  $K_s$ , рассчитанной из уравнения Моно [141], от интенсивности света (Б)

При изменении освещенности от 14 до 150  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  внутриклеточное отношение  $C/Xл$  повышалось от 15 до 40 и не зависело от исходной концентрации азота в питательной среде (рисунок 5.10).

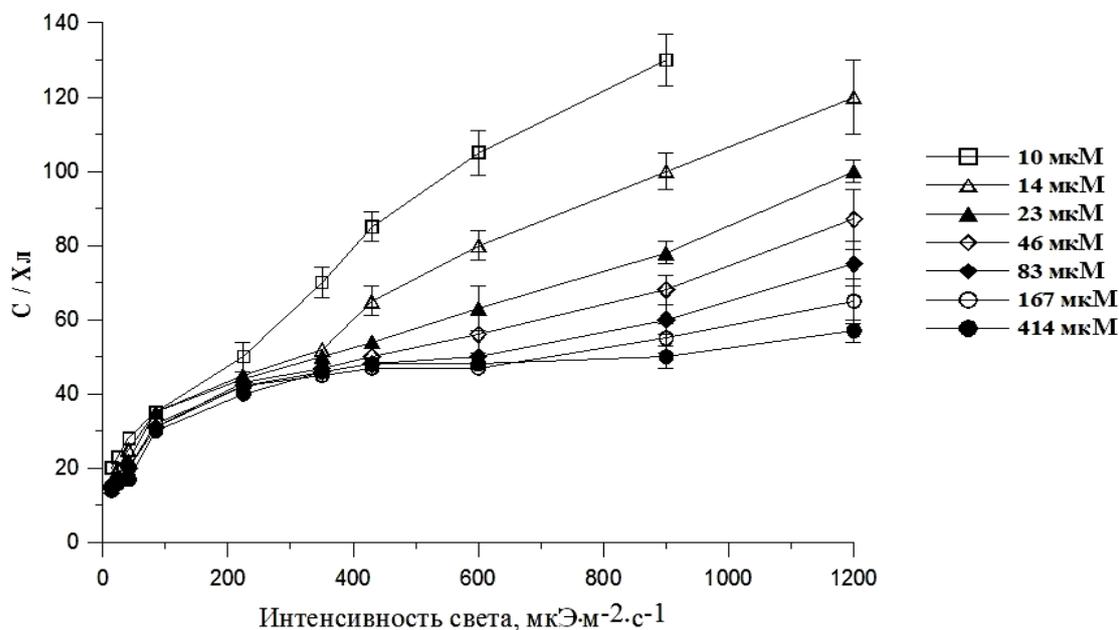


Рисунок 5.10 - Изменение световой кривой отношения  $C/Xл$  у *Phaeodactylum tricornutum* в зависимости от исходной концентрации азота (в нитратной форме) в питательной среде

В то же время при интенсивности света, превышающей  $150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , наблюдалось различие в поведении параметра в зависимости от Нисх. Так, при исходной концентрации азота в питательной среде равной 414  $\text{мкМ}$  выход световой зависимости  $C/Xл$  на плато ( $I_{\text{plato}}$ ) наблюдался при интенсивности света  $350 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , дальнейшее повышение освещенности вплоть до  $1200 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  не приводило к изменению величины отношения. По мере снижения Нисх. вид  $C/Xл-I$  зависимости менялся – появлялся восходящий загиб зависимости в области высокой освещенности, отражающий прогрессирующее уменьшение содержания хлорофилла в клетках водорослей. При минимальной в эксперименте Нисх. = 10  $\text{мкМ}$  верхняя граница светового плато ( $I_{\text{crit.}}$ ), выше которой наблюдалось резкое повышение значений  $C/Xл$  при высокой освещенности,

снижалась до  $225 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ , а повышение интенсивности света от 225 до  $900 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  сопровождалось увеличением  $C/X_{\text{л}}$  – отношения от 50 до 130. Отметим, что динамика показателя  $I_{\text{crit}}$ . (интенсивность света, выше которой наблюдается резкое повышение значений  $C/X_{\text{л}}$  при высокой освещенности) в зависимости от  $N_{\text{исх}}$ . совпадает с характером изменения параметра  $I_{\text{т}}$   $\mu$ -I зависимости (интенсивность света, выше которой наблюдается фотоингибирование скорости роста водорослей) от  $N_{\text{исх}}$ . (см. рисунок 5.8А), что позволяет заключить, что в условиях светового ингибирования между скоростью роста водорослей и отношением  $C/X_{\text{л}}$  в их клетках наблюдается обратная корреляционная зависимость.

Таким образом, результаты проведенного экспериментального исследования показали, что зависимость скорости роста и содержания хлорофилла в клетках *P. tricornutum* от исходной концентрации азота в среде в значительной мере зависит от световых условий культивирования водорослей. Изменение  $\mu$ -I и  $C/X_{\text{л}}$ -I зависимостей, наблюдаемое при интенсивности света выше  $150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  по мере снижения  $N_{\text{исх}}$ ., показывает повышение потребности водорослей в азоте при увеличении освещенности. Это, вероятно, обусловлено увеличением расхода биогена на восстановление фотоиндуцируемых повреждений фотосинтетического аппарата, а также синтез белков, необходимых для работы реакционных центров [84, 110]. Кроме того по мере повышения интенсивности света увеличивается количество фотопротекторных пигментов, для синтеза которых также необходим азот [63]. Очевидно, что в условиях высокой освещенности для поддержания скорости фотосинтеза и роста на максимальном уровне водорослям необходим большой поток азота в клетку из среды.

Известно, что кинетика потребления азота зависит от концентрации биогенного элемента в среде [113, 171] и внутри клетки [92, 161], а также от влияния абиотических факторов, в частности интенсивности света [126, 146]. В представленной работе скорость поглощения азота из среды не определялась, а в литературе по морским микроводорослям нам не удалось найти однозначный

ответ о влиянии интенсивности света на ее величину. Так, в ряде исследований показано, что скорость потребления азота из среды возрастает при повышении интенсивности света [126, 146], в других [48, 168] – интенсивность света не влияет на величину описываемого параметра. Кроме того имеются данные об угнетающем влиянии света высокой интенсивности на скорость поглощения азота из среды [57]. Тем не менее, полученные в представленной работе результаты позволяют полагать, что скорость поглощения азота из среды повышается с увеличением интенсивности света. Так, повышение отношения  $C/X_{л}$ , наблюдаемое при постоянной освещенности (при  $I \geq 150 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) по мере снижения  $N_{исх.}$ , свидетельствует об уменьшении удельного содержания азота в клетках водорослей. Ранее в разделе 4.1 показано, что при фиксированной интенсивности света отношение  $C/X_{л}$  экспоненциально возрастает при повышении  $C/N$  в клетках. При этом влияние дефицита азота на величину  $C/X_{л}$  усиливается при повышении интенсивности света, что обусловлено увеличением фотодеструкции хлорофилла при повышении облученности, происходящей на фоне снижения скорости синтеза пигмента из-за недостатка азота. В свою очередь, снижение внутриклеточной концентрации азота приводит к повышению скорости его поглощения из среды [92, 161]. Так, обедненные по азоту клетки с большей скоростью поглощают биогенный элемент из воды, чем водоросли с полным азотным пулом.

Кроме того рядом авторов показано, что снижение исходной концентрации азота в среде приводит к уменьшению потенциальной доступности биогенного элемента на единицу поверхности водорослей [12], что также может рассматриваться как косвенный фактор, снижающий скорость поступления азоту в клетку.

Основываясь на указанных фактах, можно предположить, что в условиях высокой освещенности, несмотря на избыточное содержание нитратов в воде, количество азота, поглощаемое клеткой из среды, не позволяет обеспечить все внутренние потребности водорослей в биогенном элементе. Вследствие этого происходит своего рода перераспределение внутреннего запаса азота между

клеточными компонентами. В связи с этим количество биогенного элемента, используемое непосредственно на рост и синтез хлорофилла, значительно уменьшается, что отражается в снижении значений удельной скорости роста водорослей и повышении внутриклеточного отношения  $C/Xл$ .

\* \* \*

Таким образом, эффект совместного действия интенсивности света и степени обеспеченности клеток азотом на структурно-функциональные характеристики водорослей превышает сумму влияния каждого из факторов. При интенсивности света  $14-150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  снижение исходной концентрации азота в среде от 414 до 10  $\text{мкМ}$  не влияло на удельную скорость роста и внутриклеточное отношение  $C/Xл$  у *P. tricornutum*. В то же время при освещенности выше  $150 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  снижение  $N_{исх.}$  приводило к сужению диапазона оптимальной для роста водорослей интенсивности света, увеличению степени светового ингибирования их скорости роста и прогрессирующему снижению содержания хлорофилла в клетках. Потребность водорослей в азоте по мере увеличения плотности светового потока возрастает. Наблюдаемые изменения  $\mu-I$  и  $C/Xл-I$  зависимостей при высокой освещенности, вероятно, обусловлены увеличением расхода внутриклеточного азотного пула на репарацию фотоиндуцируемых повреждений фотосинтетического аппарата и синтез фотопротекторных пигментов, а также повышением константы полунасыщения по скорости роста и поглощению азота по мере увеличения интенсивности света.

## ГЛАВА 6 ОЦЕНКА ОТНОШЕНИЯ $C/X_{л a}$ В КЛЕТКАХ ЧЕРНОМОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА В ЗИМНЕ-ВЕСЕННИЙ ПЕРИОД

Проведенное комплексное экспериментальное исследование позволило выявить основные закономерности изменения скорости роста и содержания хлорофилла в клетках водорослей в условиях культур в различных вариантах сочетания интенсивности света, температуры и степени обеспеченности азотом. Выявленные зависимости, очевидно, характерны для большинства видов микроводорослей, так как в основе изменений лежат физиологические механизмы, присущие всем фотосинтезирующим организмам. Количественные же показатели в этих зависимостях будут различаться для разных представителей фитопланктона, отражая видоспецифичность адаптации водорослей к уровню освещенности, температуры и условиям минерального питания. Полученные результаты вносят вклад в общее понимание физиологических процессов, протекающих в клетках водорослей, а также механизмах устойчивости и стратегиях адаптации водорослей к меняющимся условиям роста.

Безусловно, лабораторный эксперимент является весьма упрощенной моделью условий, наблюдаемых в природе, и не учитывает всего многообразия абиотических и биотических факторов, одновременно воздействующих на сообщество фитопланктона. В то же время в природных условиях довольно сложно выявить причинно-следственные связи между влиянием отдельного фактора и откликом живого объекта на это воздействие. Достоверно установить такого рода взаимодействия можно только в условиях лабораторного эксперимента, что, бесспорно, является преимуществом такого рода исследований. Но закономерным является вопрос возможности применения зависимостей, полученных на культурах, для природных популяций водорослей.

В настоящем разделе проведено сравнение результатов, полученных на культурах водорослей в ходе лабораторного эксперимента, с имеющимися в литературе данными по количественному изменению отношения  $C/X_{л}$

фитопланктона в природных условиях. Для этого выполнялись две основные задачи. Первая - на основании массива полученных экспериментальных данных разработать единое уравнение для количественного описания совместного действия интенсивности света и температуры на изменение отношения  $C/X_{л}$  у трех видов диатомовых водорослей. Вторая - сравнить полученные результаты с имеющимися в литературе данными по количественному изменению отношения  $C/X_{л}$  в природных условиях в сходных световых и температурных условиях роста. На основании чего оценить возможность применения предложенного уравнения для оценки отношения  $C/X_{л}$  фитопланктона Черного моря в зимне-весенний период (с декабря по апрель), когда интенсивность света и температура являются основными абиотическими факторами, оказывающими влияние на изменчивость концентрации хлорофилла у планктонных водорослей [40, 41, 172], а по численности и биомассе в фитопланктоне преобладают диатомовые водоросли [7, 23, 41, 172].

На рисунке 6.1А представлены обобщенные световые зависимости  $C/X_{л}$ , объединяющие значения отношения у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* при каждой из исследованных температур. Для анализа были использованы только значения отношения  $C/X_{л}$ , полученные в диапазоне освещенности ниже  $I_{crit}$  (интенсивность света, выше которой наблюдается подъем значений  $C/X_{л}$  в области высокой освещенности), то есть соответствующие участкам светового лимитирования и насыщения роста. Значения отношения  $C/X_{л}$ , регистрируемые в области ингибирующих рост водорослей освещенностей ( $I > I_{crit}$ ), были исключены из анализа ввиду сложности их количественного описания, так как значения параметров  $I_{crit}$  и  $C/X_{л_{max}}$ , описывающих  $C/X_{л}$ - $I$  зависимость в области высоких освещенностей, зависят не только от температуры культивирования водорослей, но и сильно различается между исследуемыми видами (см. раздел 4.1.3).

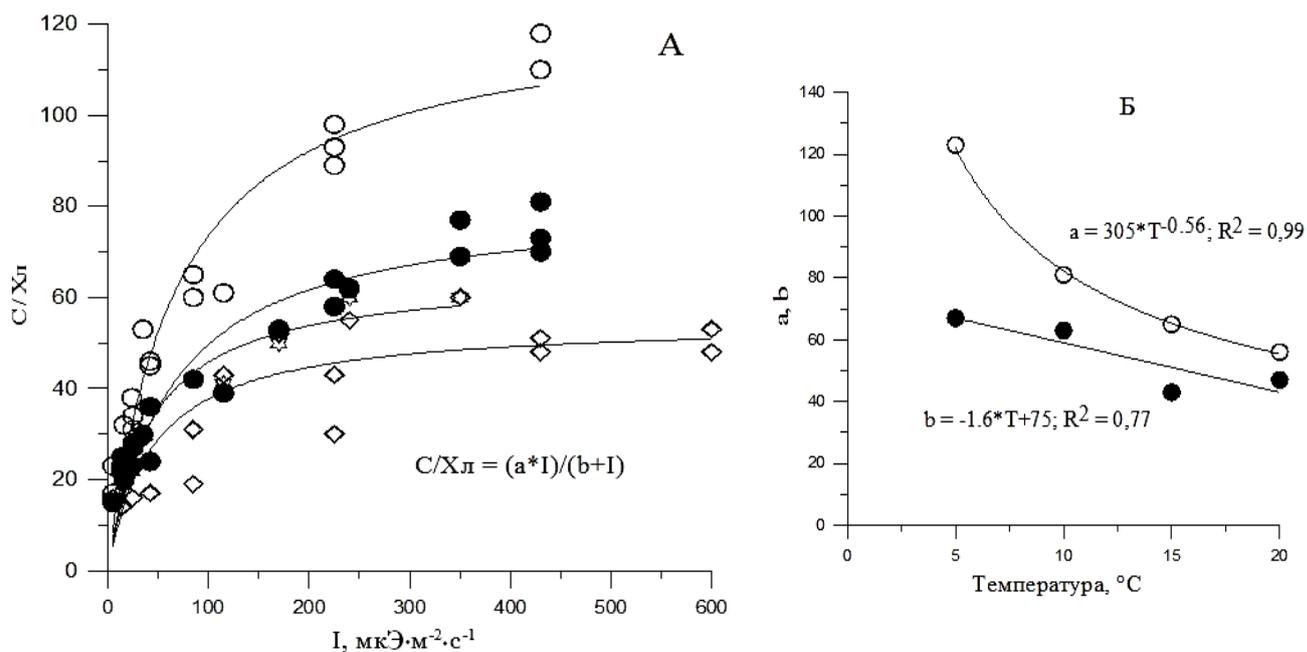


Рисунок 6.1 – А - Обобщенные световые зависимости внутриклеточного отношения  $C/X_{л}$  у *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* (без учета участка  $I > I_{crit}$ ) при 5 (○), 10 (●), 15 (◻) и 20 °C (◇). Б - Температурная зависимость коэффициентов  $a$  (○) и  $b$  (●) уравнения (6.1)

Из представленного на рисунке 6.1А графика видно, что в диапазоне освещенностей, где свет не оказывает ингибирующего действия на структурно-функциональные характеристики водорослей, границы изменчивости отношения  $C/X_{л}$  от интенсивности света при каждой из исследованных температур слабо различаются между видами, а  $C/X_{л}$ - $I$  зависимость с высоким коэффициентом детерминации описывается уравнением вида:

$$C/X_{л} = (a \cdot I) / (b + I), \quad (6.1)$$

Значения коэффициентов представленного уравнения, полученные при разной температуре, сведены в таблице 6.1, а их температурная зависимость имеет вид:  $a = 305 \cdot T^{-0.56}$ ;  $b = -1.6 \cdot T + 75$  (рисунок 6.1Б).

Таблица 6.1 - Изменение параметров уравнения (6.1) в зависимости от температуры культивирования водорослей

Параметр	Температура			
	5 °С	10 °С	15 °С	20 °С
a	123	81	65	56
b	67	63	43	47
N	19	22	8	22
R <sup>2</sup>	0.94	0.91	0.93	0.78

Примечание: a и b – коэффициенты уравнения (6.1); n – число измерений; R<sup>2</sup> – коэффициент детерминации

Опираясь на полученные результаты, предложено единое уравнение, позволяющее количественно описать совместное действие интенсивности света (I, мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>) и температуры (Т, °С) на изменение внутриклеточного отношения С/Хл у диатомовых водорослей *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum*:

$$C/X_{л} = \frac{305 \cdot T^{-0.56} \cdot I}{(-1.6 \cdot T + 75) + I} \quad (6.2)$$

Сравнение значений С/Хл, измеренных в экспериментах с *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum*, с величинами отношения, рассчитанными по уравнению (6.2), показывает их высокую сопоставимость (рисунок 6.2). Ошибка аппроксимации предложенного уравнения (среднее отклонение расчетных значений от фактических) не превышает 18 %.

Предложенное уравнение применимо для прогнозирования изменчивости отношения С/Хл в диапазоне интенсивности света I = 14–430 мкЭ·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> (1,2–37 Э·м<sup>-2</sup>·сут<sup>-1</sup>) и температуры Т = 5–20 °С, что позволяет сравнить расчетные значения отношения углерода к хлорофиллу с имеющимися в литературе данными по количественному изменению С/Хл в клетках черноморского фитопланктона в зимне-весенний период года.

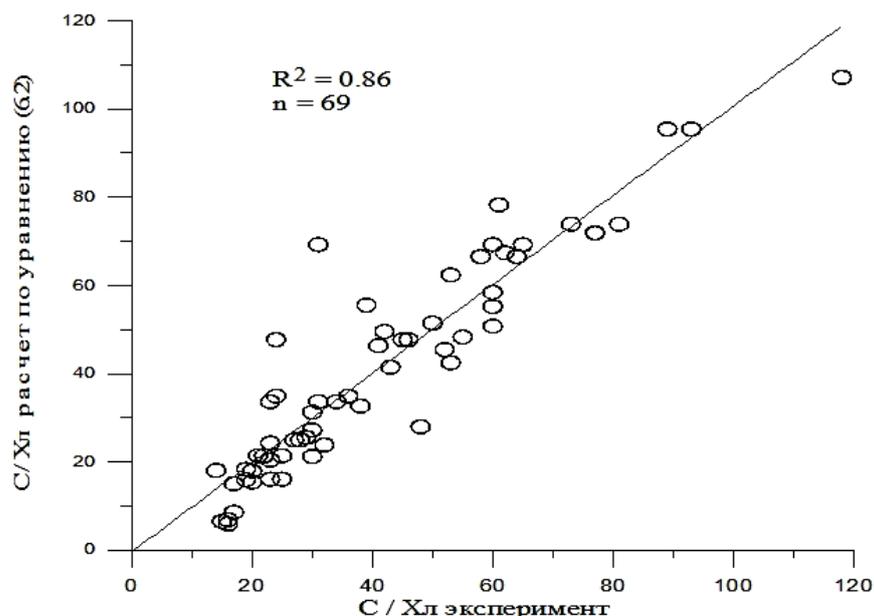


Рисунок 6.2 - Сравнение рассчитанных по уравнению (6.2) значений отношения C/Xл с измеренными данными. Линия показывает отношение 1:1

Согласно уравнению (6.2) минимальные величины отношения C/Xл в клетках водорослей наблюдаются при низких значениях интенсивности света и температуры и высокой доступности минерального азота в среде. В природных условиях такое сочетание факторов характерно для зимнего периода. По данным многолетних натуральных наблюдений [6, 44, 45, 172] показано, что минимальные значения C/Xл фитопланктона Черного моря наблюдаются именно в зимний период, когда температура воды и интенсивность падающей на поверхность моря ФАР минимальны. Далее на фоне повышения интенсивности света и температуры воды от зимы к лету отмечается снижение концентрации хлорофилла и соответствующее ему повышение величины C/Xл. Максимальные значения отношения отмечаются летом, что в большей степени обусловлено высокими величинами ФАР и низкой доступностью биогенных веществ. Осенью величина отношения снижается примерно до значений, наблюдаемых в весенний период.

В таблице 6.2 приведены среднемесячные значения интенсивности света и температуры, регистрируемые в Черном море с декабря по апрель за период с 2003 по 2015 гг. Температура воды (Т) и интенсивность ФАР ( $I_0$ ), достигающая

поверхности моря, получены из спутниковых наблюдений, взятых из <https://oceandata.sci.gsfc.nasa.gov>. Расчет отношения С/Хл по уравнению (6.2) проводили относительно приведенных в таблице значений Т и  $I_{ср}$ , где  $I_{ср}$  – средняя интенсивность света в верхнем квазиоднородном слое (ВКС) моря. Ширина ВКС, как известно, определяется интенсивностью перемешивания вод и достигает 30–35 м в зимние месяцы [13], а фитопланктон, вегетирующий в пределах этого слоя, адаптирован к средней облученности в нем. При расчете  $I_{ср}$  в пределах ВКС использовали данные по ширине ВКС, полученные из работы [13], и зависимость между шириной ВКС и световыми условиями в нем, приведенную в исследовании [51] для западной глубоководной области моря, а также расчетные значения  $I_{ср}$ , представленные в работе [71].

Таблица 6.2 - Среднемесячные значения интенсивности света и температуры, регистрируемые в Черном море в зимне-весенний период (2003-2015 гг.), и соответствующие им расчетные значения отношения С/Хл по уравнению (6.2)

Месяц	$I_0$ , $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$	$I_{ср}$ , $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$	Т, °С	С/Хл, мг/мг
Декабрь	6–12 $9\pm 1,3$	1,5–3,5 $2,4\pm 0,8$	9–12	19–40
Январь	8–13 $10\pm 1,4$	1,5–4,5 $3,5\pm 1,1$	8–10	20–48
Февраль	10–23 $16\pm 2$	3–8 $6,3 \pm 2,2$	6–8	36–66
Март	18–34 $25\pm 2,2$	4–14 $8,9\pm 2,9$	8–10	38–70
Апрель	30–45 $39\pm 2,9$	12–35 $19\pm 10,2$	10–13	55–77

Примечание:  $I_0$  - интенсивность ФАР, падающей на поверхность моря;  $I_{ср}$  – средняя облученность в ВКС; Т – температура. Первая строка - диапазон изменчивости параметра, вторая – его среднемесячное значение  $\pm$  стандартное отклонение

Сравнительная оценка значений  $C/Xл$ , регистрируемых в Черном море с декабря по февраль, с величинами отношения, рассчитанными по уравнению (6.2) в сходных световых и температурных условиях роста, в целом показывает высокую сходимость получаемых данных. Так, среднемесячные значения отношения  $C/Xл$  за период с 2000 по 2010 гг., приводимые в работе [31] для декабря, января и февраля составляют  $46 \pm 19$ ,  $56 \pm 22$  и  $59 \pm 15$  в прибрежных районах Черного моря и  $42 \pm 20$ ,  $48 \pm 22$  и  $50 \pm 20$  в его глубоководной области. Соответствующие им величины  $C/Xл$ , рассчитанные по уравнению (6.2) в светотемпературных условиях, характерных для декабря, изменяются в пределах – от 19 до 40, для января - от 20 до 48, для февраля – от 36 до 66 (см. таблицу 6.2). По данным Финенко с соавторами удельное содержание хлорофилла у черноморского фитопланктона в пределах эвфотической зоны в январе – феврале близко к  $0,025$  мг  $Xл/мг$   $C$  ( $C/Xл = 40$ ) [44]. Схожие результаты получены и в работе [49], авторы отмечают, что минимальные значения внутриклеточного отношения  $C/Xл$  фитопланктона прибрежной части Черного моря (вблизи Севастополя) наблюдаются в январе – феврале и составляют 25–50.

Зимой фитопланктонное сообщество Черного моря характеризуется низким уровнем видового разнообразия. В этот период в прибрежных водах, как правило, доминирует мелкоклеточная диатомовая водоросль *S. costatum*. Так, по данным Брянцевой в 2004–2006 гг. вклад *S. costatum* в суммарную численность фитопланктона Севастопольской бухты составил от 89 % в январе до 94 % в феврале [7]. Исследование видового разнообразия микроводорослей в прибрежных водах Крыма, проводимое Сеничевой в период 1983–2006 гг., показало, что в годы с холодными зимами ( $T < 8$  °C) при интенсивном конвекционном перемешивании вод вклад *S. costatum* в общую биомассу фитопланктона может достигать 95–98 %. Пик развития вида приходится на ранневесенний период (февраль-март), в этот период отмечается температурный минимум (6–8 °C) и максимальная концентрация минеральных солей. В годы с более теплой зимой ( $T = 8–12$  °C) и менее интенсивным конвективным перемешиванием вод видовое разнообразие водорослей значительно

увеличивается, но *S. costatum* по-прежнему остается одним из доминирующих видов [28].

Очевидно, что доминирование *S. costatum* в условиях низкой освещенности и температуры обусловлено определенными конкурентными преимуществами вида перед другими представителями фитопланктона, позволяющими ей занимать преобладающую позицию в море в зимний и ранневесенний период. Результаты проведенных экспериментов (см. раздел 3) позволили выявить ряд индивидуальных физиологических особенностей вида при культивировании в условиях «низкий свет – низкая температура». Так, для *S. costatum* характерна высокая эффективность роста -  $0,13 \text{ сут}^{-1} \cdot (\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1})^{-1}$  - в условиях светового лимитирования, что сопоставимо с максимально зарегистрированными значениями этого параметра в целом у микроводорослей. Вторая особенность вида - низкие значения  $I_k$   $\mu$ -I зависимости (интенсивность света, характеризующая начало светового насыщения скорости роста водорослей), что свидетельствует о способности *S. costatum* развивать максимальную скорость роста при очень низких значениях интенсивности света. В эксперименте показано, что при температуре 5 °C  $I_k$  составила 12  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , при 10 °C – 18  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ , а при 15 °C повышалась до 24  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Для сравнения у *P. tricornutum* и *Nitzschia sp.* № 3 величина  $I_k$  при 10 °C равна 40 и 33  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно. По литературным данным насыщение скорости роста диатомовых водорослей при оптимальной температуре (18-22 °C) отмечается в среднем при 84  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  [158], а учитывая примерно двукратное снижение величины  $I_k$  при температуре 10 °C, описываемая величина уменьшается до 40  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Согласно расчетам, проведенным Стельмах, величина  $I_k$  фитопланктона поверхностного слоя Черного моря в зимний период составляет порядка 2  $\text{Э} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$  (25  $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) [31]. В экспериментальной работе [1] показано, что для *S. costatum* характерны максимальные значения скорости роста среди видов диатомового комплекса зимне-весенней сукцессии Черного моря. Величина скорости роста является одним из главных факторов, обеспечивающих преобладающее развитие вида при прочих равных условиях.

В марте интенсивность падающей на поверхность моря ФАР достигает 18-34  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$ , средняя облученность в ВКС варьирует в пределах 4-14  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  (46-162  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ), температура воды при этом равна 8–10 °С. Среднемесячное значение отношения С/Хл для марта, приводимое в работе [31], составляет  $80\pm 40$  и  $58\pm 24$  для прибрежных и глубоководных районов Черного моря. Соответствующий ему диапазон расчетных значений С/Хл по уравнению (6.2) находится в пределах 38–70. Согласно модельного расчета сезонной динамики отношения С/Хл за период 1998 по 2008 гг., выполненного Финенко с соавторами на основании данных дистанционного зондирования концентрации хлорофилла, коэффициента удельного поглощения света хлорофиллом и средней облученности в ВКС, изменчивость отношения С/Хл в марте в глубоководной области моря находится в пределах 56–77 и 45–63 в районах восточного антициклонического и западного циклонического круговоротов соответственно [38].

В апреле интенсивность ФАР, падающей на поверхность Черного моря, повышается до 30–45  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$ , средняя освещенность в ВКС варьирует при этом в пределах от 11 до 35  $\text{Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  (127–405  $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ). Широкий диапазон изменчивости значений  $I_{\text{ср}}$  обусловлен началом формирования температурной стратификации вод. Так, по данным [13] средняя ширина ВКС в первой и второй половине апреля составляет порядка 18 и 13 м соответственно. Температура воды равна 10-13 °С. Изменение условий роста приводит к смене видового состава фитопланктонного сообщества и значительному увеличению его разнообразия. По данным Сеничевой в ходе зимне-весенней сукцессии черноморского фитопланктона в годы с теплой весной в апреле-мае холодолюбивые мелкоклеточные диатомовые виды сменяются более теплолюбивыми – *Chaetoceros curvisetus*, *C. affinis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Proboscia alata*, *Dactiliosolen fragilissimus*. В то же время автор отмечает, что в годы с холодной весной *S. costatum* может доминировать в планктоне вплоть до конца мая [28]. Среднемесячная величина отношения С/Хл фитопланктона поверхностного слоя прибрежных вод Черного моря в апреле равна  $90\pm 47$ , для глубоководной части моря эта величина составляет  $130\pm 76$  [31]. По данным модельного расчета

Финенко с соавторами [38] диапазон изменчивости  $C/Xл$  в клетках планктонных водорослей в глубоководной области моря составляет 71–100 и 83–125 в районах восточного антициклонического и западного циклонического круговоротов соответственно. Как видно из таблицы 6.2 величины отношения  $C/Xл$ , рассчитанные по уравнению (6.2), для апреля находятся в пределах от 55 до 77. Такие значения  $C/Xл$  соответствуют нижней границе диапазона изменчивости отношения, приводимого в вышеуказанных работах для апреля, но, вероятно, являются несколько заниженными относительно реальных величин  $C/Xл$  в море. Это, на наш взгляд, может быть обусловлено изменением соотношения между диатомовыми и динофитовыми водорослями, которые, как известно, создают основную численность и биомассу фитопланктона Черного моря [7, 28, 32]. У динофитовых водорослей внутриклеточное содержание хлорофилла на единицу углерода значительно ниже, чем у диатомовых [69, 89, 97], ввиду этого увеличение доли динофитовых водорослей в фитопланктоне, очевидно, будет сопровождаться повышением суммарной величины отношения  $C/Xл$ .

Ранее в обзоре литературы (см. раздел 1) было отмечено, что моделей, описывающих совместное действие нескольких факторов среды на изменение удельного содержания хлорофилла у микроводорослей, не много. Одной из них является зависимость, предложенная Клоерном с соавторами для описания комбинированного эффекта интенсивности света ( $I$ ), температуры ( $T$ ) и питательных веществ на изменчивость отношения  $Xл/C$  [74]:

$$Xл/C = 0,003 + 0,0154 \cdot \exp(0,05 \cdot T) \cdot \exp(-0,059 \cdot I) \cdot \mu', \quad (6.3)$$

где 0,003 – минимально возможное значение отношения  $Xл/C$ , принятое по литературным данным;

$\mu'$  - относительная скорость роста, лимитированная азотом ( $\mu/\mu_{max}$ ),  $\mu_{max}$  – скорость роста в условиях обеспеченности клеток азотом при освещенности  $I$  и температуре  $T$ .

Уравнение (6.3) справедливо для диапазона температур 0-25 °С и интенсивности света  $I < 30 \text{ Э}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сут}^{-1}$  ( $350 \text{ мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ ). Расчет коэффициентов уравнения произведен авторами на основании 219 измерений отношения Хл/С у 14 видов микроводорослей, 9 из которых представители диатомовых.

На рисунке 6.4 приведено сравнение значений отношения С/Хл, рассчитанного по уравнению Клоерна (6.3), со значениями измеренными в культурах диатомовых водорослей *P. tricornutum*, *Nitzschia sp. № 3* и *S. costatum* в идентичных свето-температурных условиях,  $\mu'$  в расчете было принято равным 1, что соответствует условиям полной обеспеченности водорослей минеральным питанием.

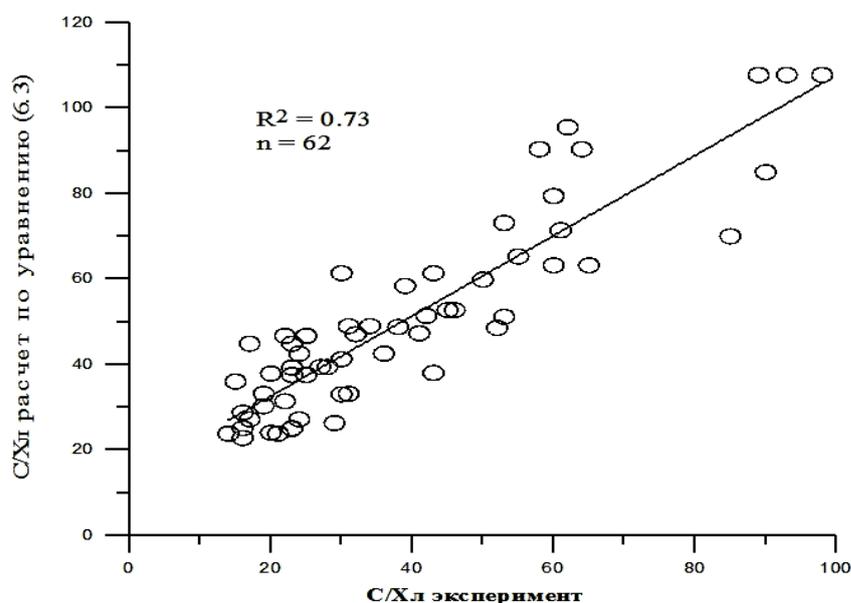


Рисунок 6.4 - Сравнение рассчитанных по уравнению (6.3) значений отношения С/Хл с измеренными у диатомовых водорослей в условиях лабораторного эксперимента

Результаты демонстрируют, что уравнение Клоерна (6.3) объясняет 73 % изменчивости отношения С/Хл, в то время как для уравнения (6.2), предложенного в представленной работе, эта величина достигает 86 % (см. рисунок 6.2). Полученное различие объясняется тем, что абсолютные значения С/Хл, рассчитанные по уравнению Клоерна на 15-20 % выше полученных по

уравнению (6.2). В целом значения  $C/Xл$ , рассчитанные по двум представленным уравнениям, достаточно хорошо согласуются с измеренными данными. Однако уравнение (6.2) более эффективно при прогнозировании изменений отношения углерода к хлорофиллу, вызванных совместным действием интенсивности света и температуры по сравнению с моделью, предложенной в работе [74].

\* \* \*

Таким образом, на основании экспериментальных данных, полученных в лабораторных условиях на культурах трех видов диатомовых водорослей, предложена модель, позволяющая оперативно оценивать внутриклеточное отношение  $C/Xл$  черноморского фитопланктона в зимне-весенний период (с декабря по апрель), когда в фитопланктоне преобладают диатомовые водоросли, а интенсивность света и температура являются основными факторами, определяющими изменчивость отношения органического углерода к хлорофиллу в клетках планктонных водорослей. Преимуществом предложенного подхода является простота и малое число входных параметров – интенсивность света и температура. Рассчитанные по уравнению (6.2) величины  $C/Xл$  согласуются как с данными натурных измерений этого параметра, так и с результатами его модельных расчетов другими авторами в сходных световых и температурных условиях роста.

## ВЫВОДЫ

1. Тангенс начального угла наклона световой зависимости скорости роста, отражающий эффективность роста водорослей в условиях светового лимитирования, не зависит от температуры и степени обеспеченности клеток азотом. В области светового оптимума температурно-зависимое изменение скорости роста исследованных видов водорослей описывается уравнением Аррениуса, температурный коэффициент  $Q_{10}$  изменяется в пределах 1,7-2,5. Зависимость скорости роста от степени обеспеченности водорослей азотом с высокой точностью описывается уравнением Друпа. Снижение температуры культивирования и степени обеспеченности клеток азотом приводит к сужению диапазона оптимальной для роста водорослей интенсивности света и усилению степени светового ингибирования.

2. Диапазон изменчивости отношения  $C/X_l$  определяется условиями выращивания водорослей. У всех исследованных диатомовых водорослей влияние светового фактора при оптимальной для роста температуре 20 °С и полной обеспеченности минеральным питанием определяет адаптивные изменения отношения  $C/X_l$  от 15 до 60-85. Снижение температуры и степени обеспеченности клеток азотом приводит к расширению диапазона изменчивости  $C/X_l$  в области максимальных значений до 150-200 при 10 °С и до порядка 300 при температуре 5 °С.

3. В условиях светового лимитирования роста величина  $C/X_l$  слабо зависит от степени обеспеченности клеток азотом, а снижение температуры культивирования приводит к экспоненциальному повышению начального угла наклона световой зависимости  $C/X_l$ . В диапазоне оптимальных для роста значений освещенности зависимость отношения  $C/X_l$  от температуры и степени обеспеченности клеток азотом описывается экспоненциальной зависимостью, при этом модуль отрицательного показателя экспоненты увеличивается по мере повышения освещенности. В диапазоне ингибирующих значений света снижение

температуры и степени обеспеченности водорослей азотом приводит к прогрессирующему снижению содержания хлорофилла в их клетках, вызванному уменьшением скорости синтеза пигмента на фоне его интенсивного фотоокисления.

4. В условиях светового ингибирования снижение скорости роста водорослей происходит на фоне светозависимого увеличения отношения углерода к хлорофиллу *a* (С/Хл) в их клетках.

5. Совместное влияние температуры и степени обеспеченности клеток азотом на изменение скорости роста и внутриклеточного отношения С/Хл у микроводорослей носит аддитивный характер.

6. Внутриклеточный запас азота *Phaeodactylum tricornutum* обеспечивает почти двукратное увеличение биомассы водорослей по углероду после истощения запасов неорганических соединений этого элемента в среде.

7. На основе экспериментальных исследований с использованием культур микроводорослей получено уравнение для оценки комплексного влияния света и температуры на внутриклеточное отношение С/Хл и показана возможность его использования для черноморского фитопланктона в зимне-весенний период.

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$I$  – интенсивность света

$T$  - температура

$\mu$  – скорость роста водорослей

$\mu_{\max}$  – максимальная скорость роста водорослей

$\mu'$  – относительная скорость роста водорослей ( $\mu/\mu_{\max}$ )

$\alpha$  – начальный угол наклона  $\mu$ - $I$  кривой, эффективность роста

$I_k$  – интенсивность света, характеризующая начало светового насыщения роста водорослей

$I_t$  – интенсивность света, выше которой наблюдается ингибирование роста водорослей

$I_b$  – параметр, отражающий степень фотоингибирования скорости роста

$Q_{10}$  – температурный коэффициент, отражающий изменение скорости роста при изменении температуры на  $10^{\circ}\text{C}$

$X_{l\ a}$  – концентрация хлорофилла  $a$

$C/X_{l\ a}$  - отношение органического углерода к хлорофиллу в клетках водорослей

$C/X_{l\ \min}$  и  $C/X_{l\ \max}$  - минимальное и максимальное значения отношения  $C/X_{l\ a}$

$k$  - начальный угол наклона зависимости отношения  $C/X_{l\ \text{свет}}$

$I_{\text{plato}}$  - интенсивность света, при которой кривая  $C/X_{l\ \text{свет}}$  выходит на плато

$I_{\text{crit}}$  - верхняя граница светового плато зависимости  $C/X_{l\ \text{свет}}$

$b$  - угол наклона восходящего участка кривой  $C/X_{l\ \text{свет}}$  при  $I > I_{\text{crit}}$

$C/N$  – атомарное отношение между углеродом и азотом

$C/N_{\max}$  и  $C/N_{\min}$  – максимальное и минимальное отношение между углеродом и азотом в клетке

$N/P$  - атомарное отношение между азотом и фосфором

$N_{\text{исх.}}$  - исходное содержание азота (в нитратной форме) в питательной среде

$N$  – содержание азота (в нитратной форме) в среде

$K_s$  – константа полунасыщения

ФАР – фотосинтетически активная радиация

ВКС – верхний квазиоднородный слой

$I_0$  – интенсивность ФАР, достигающая поверхности моря

$I_{cp}$  - средняя интенсивность света в верхнем квазиоднородном слое моря

РЦ – реакционный центр

ФС – фотосистема

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимов, А.И. Характеристики роста и флуоресценции некоторых видов водорослей при акклимации к различным температурам в условиях культур / А.И. Акимов, Е.С. Соломонова // Океанология. – 2019. – Т. 59, № 3. – С. 347–359.
2. Артюхова, В.И. Кинетика роста, потребления и потребности в азоте и фосфоре четырех видов зеленых микроводорослей / В.И. Артюхова, Н.И. Быкова, С.В. Горюнова, А.П. Левич // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 1988. – № 1. – С. 47–52.
3. Бардан, С.И. Формирование бимодального сценария сукцессии автотрофных компонент планктона в Баренцевом и Черном морях и оценка роли температурного фактора / С.И. Бардан, Н.Г. Сербов // Вісник Одеського державного екологічного університету. – 2013. – № 16. – С. 90–114.
4. Белевич, Т.А. Влияние растворенного органического вещества на фотосинтез диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* / Т.А. Белевич, Л.В. Ильяш, Д.Н. Маторин // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2001. – № 4. – С. 32–38.
5. Берсенева, Г.П. Адаптация морских планктонных водорослей к свету / Г.П. Берсенева, Л.М. Сергеева, З.З. Финенко // Океанология. – 1978. – Т. 18, № 2. – С. 298–306.
6. Берсенева, Г.П. Сезонная изменчивость хлорофилла и биомассы фитопланктона в западной части Черного моря / Г.П. Берсенева, Т.Я. Чурилова, Л.В. Георгиева // Океанология. – 2004. – Т. 44, № 3. – С. 389–398.
7. Брянцева, Ю.В. Особенности сезонной сукцессии фитоценозов Севастопольской бухты в 2004–2006 гг. / Ю.В. Брянцева // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / под. ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 18–23.

8. Волошко, Л.Н. Чувствительность *Synechocystis aquatilis* Sauv. (Cyanophyta) к ионам цинка / Л.Н. Волошко, О.В. Гаврилова // Альгология. – 1992. – Т. 2, № 1. – С. 77–80.
9. Гапочка, Л.Д. Об адаптации водорослей / Л.Д. Гапочка. – Москва : Изд-во Московского университета, 1981. – 80 с.
10. Геворгиз, Р.Г. Деградация пигментов у *Spirulina platesis* (Nordst.) Geitl. в условиях голодания по фосфору / Р.Г. Геворгиз, Ю.Н. Головня // Экология моря. – 2002. – Вып. 60. – С. 21–26.
11. Геворгиз, Р.Г. Методика измерения оптической плотности суспензии низших фототрофов на длине волны света 750 нм / Р.Г. Геворгиз, С.Г. Щепачев. – Севастополь : ИнБЮМ НАНУ, 2008. – 11 с.
12. Гончаров, А.Ю. Зависимость удельной продукции микроводорослей от обеспеченности поверхности клеток биогенными элементами / А.Ю. Гончаров, А.Б. Зотов // Экология моря. – 2003. – Вып. 64. – С. 51–55.
13. Дорофеев, В.Л. Моделирование декадной изменчивости экосистемы Черного моря / В.Л. Дорофеев // Морской гидрофизический журнал. – 2009. – № 6. – С. 71–81.
14. Кривенко, О.В. Содержание и потребление неорганических соединений азота в Чёрном море / О.В. Кривенко // Морской экологический журнал. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 13–26.
15. Кузнецова, А.В. Влияние дефицита азота на рост и состояние фотосинтетического аппарата зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* / А.В. Кузнецова, С.И. Погосян, Е.Н. Воронова, И.В. Конюхов, А.Б. Рубин // Вода: химия и экология. – 2012. – № 4. – С. 68–76.
16. Левич, А.П. Теоретическая и экспериментальная экология фитопланктона. Управление структурой и функциями сообществ / А.П. Левич, В.Н. Максимов, Н.Г. Булгаков. – Москва : Изд-во НИЛ, 1997. – 186 с.
17. Максимова, М.П. Минеральное питание и проблема обеспеченности фитопланктона питательными солями / М.П. Максимова. – Москва : ЦНИИТЭИРХ, 1977. – 39 с.

18. Маркина, Ж.В. Влияние снижения солености воды на рост и некоторые биохимические показатели *Chaetoceros socialis* F. *Radians* (F. Schutt) Proschk.-Lavr. (*Bacillariophyta*) / Ж.В. Маркина, Н.А. Айздайчер // Альгология. – 2010. – Т. 20, № 4. – С. 402–412.
19. Медведев, С.С. Физиология растений : учебник / С.С. Медведев. – Санкт-Петербург : БХВ-Петербург, 2013. – 496 с.
20. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – Москва : ВНИРО, 1988. – 119 с.
21. Паламодова, О.С. Динамика фотоадаптации некоторых видов диатомовых водорослей / О.С. Паламодова // Экология моря. – 2009. – Вып. 78. – С. 70–74.
22. Парсонс, Т.Р. Биологическая океанография / Т.Р. Парсонс, М. Такахаши, Б. Харгрейв. – Москва : Легкая промышленность, 1982. – 432 с.
23. Пospelова, Н.В. Фитопланктон / Н.В. Пospelова, М.И. Сеничева // Биология Черного моря у берегов Юго-Восточного Крыма / под ред. Н.С. Костенко. – Симферополь : ИТ «АРИАЛ». – 2018. – С. 164–171.
24. Прошкина-Лавренко, А.И. Диатомовые водоросли планктона Черного моря / А.И. Прошкина-Лавренко. – Москва ; Ленинград : Изд-во АН СССР, 1955. – 222 с.
25. Рабинович, Е. Фотосинтез : пер. с англ. / Е. Рабинович. – Москва : Иностранная литература, 1951–1959. – Т. 1–3. – Т. 1, 648 с. ; Т. 2, 651 с. ; Т. 3, 936 с.
26. Рубин, А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге / А.Б. Рубин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 4. – С. 7–13.
27. Рубин, А.Б. Регуляция первичных процессов фотосинтеза / А.Б. Рубин, Т.Е. Кренделева // Успехи биологической химии. – 2003. – № 43. – С. 225–266.
28. Сеничева, М.И. Видовое разнообразие, сезонная и межгодовая изменчивость микроводорослей в планктоне у берегов Крыма / М.И. Сеничева // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и

- биотехнологического использования / под. ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 5–17.
29. Смашевский, Н.Д. Экология фотосинтеза / Н.Д. Смашевский // Астраханский вестник экологического образования. – 2014. – № 2 (28). – С. 165–180.
30. Соловченко, А.Е. Пигментный состав, оптические свойства и устойчивость к фотодеструкции микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, культивируемой при высокой освещенности / А.Е. Соловченко, О.Б. Чивкунова, И.П. Маслова // Физиология растений. – 2011. – Т. 58, № 1. – С. 12–20.
31. Стельмах, Л.В. Закономерности роста фитопланктона и его потребление микрозоопланктоном в Черном море: дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.10 / Стельмах Людмила Васильевна. – Севастополь, 2017. – 310 с.
32. Стельмах, Л.В. Сезонная изменчивость отношения органического углерода к хлорофиллу “а” и факторы, ее определяющие в фитопланктоне прибрежных вод Черного моря / Л.В. Стельмах, И.И. Бабич // Морской экологический журнал. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 74–88.
33. Стельмах, Л.В. Культуры динофитовых водорослей Черного моря: экспериментальные исследования и практическое значение / Л.В. Стельмах, И.М. Мансурова, А.И. Акимов // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2014. – № 11. – С. 260–266.
34. Тихонов, А.Н. Защитные механизмы фотосинтеза / А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 16–21.
35. Тихонов, А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза / А.Н. Тихонов // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 11. – С. 8–15.
36. Тренкеншу, Р.П. Математическая модель светозависимого содержания пигментов в клетках морских микроводорослей в хемостате / Р.П. Тренкеншу, А.Б. Боровков, А.В. Ширяев // Экология моря. – 2005. – Вып. 69. – С. 58–63.
37. Тренкеншу, Р.П. Содержание хлорофилла в биомассе морских микроводорослей при световом лимитировании (модель) / Р.П. Тренкеншу,

- Т.М. Новикова // Морской биологический журнал. – 2019. – Т. 4, № 4. – С. 100–102.
38. Финенко, З.З. Новый подход к оценке биомассы фитопланктона и ее вариабельности в поверхностном слое Черного моря по спутниковым данным / З.З. Финенко, И.В. Ковалева, В.В. Суслин // Успехи современной биологии. – 2018. – Т. 138, № 3. – С. 294–307.
39. Финенко, З.З. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды / З.З. Финенко, Л.А. Ланская // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / под ред. К.М. Хайлова. – Киев : Наукова думка, 1971. – С. 22–51.
40. Финенко, З.З. Динамика концентрации хлорофилла *a* в Чёрном море по спутниковым измерениям / З.З. Финенко, И.М. Мансурова, В.В. Суслин // Морской биологический журнал. – 2019. – Т. 4, № 2. – С. 87–95.
41. Финенко, З.З. Сезонная динамика структурных и функциональных показателей фитопланктонного сообщества в Севастопольской бухте / З.З. Финенко, Л.В. Стельмах, И.М. Мансурова, Е.Ю. Георгиева, В.С. Цилинский // Системы контроля окружающей среды. – 2017. – № 9 (29). – С. 73–82.
42. Финенко, З.З. Пигменты в морских одноклеточных водорослях и интенсивность фотосинтеза / З.З. Финенко, В.С. Тен, Д.К. Акинина, Л.М. Сергеева, Г.П. Берсенева // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / под ред. К.М. Хайлова. – Киев : Наукова думка, 1971. – С. 51–92.
43. Финенко, З.З. Культивирование водорослей в лабораторных условиях / З.З. Финенко, Л.В. Стельмах, О.А. Галатонова, И.И. Бабич, И.А. Харчук // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / под. ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 186–201.
44. Финенко, З.З. Вертикальное распределение хлорофилла и флуоресценции в Черном море / З.З. Финенко, Т.Я. Чурилова, Р.И. Ли // Морской экологический журнал. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 15–45.

45. Финенко, З.З. Оценка биомассы фитопланктона и первичной продукции в Черном море по спутниковым данным / З.З. Финенко, Т.Я. Чурилова, В.В. Суслин // Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей / под ред. В.Н. Еремеева, А.В. Гаевской, Г.Е. Шульмана, Ю.А. Загородней. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 220–237.
46. Фурсова, П.В. Дифференциальные уравнения в моделировании сообществ микроорганизмов / П.В. Фурсова, А.П. Левич // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126, № 2. – С. 149–179.
47. Хит, О. Фотосинтез : физиологические аспекты / О. Хит ; под ред. и с предисл. Л. Н. Белла. – Москва : Мир, 1972. – 315 с.
48. Чербаджи, И.И. Влияние факторов среды на скорость поглощения аммония и ортофосфата популяцией красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* в заливе измены (о.Кунашир) / И.И. Чербаджи // Известия ТИНРО (Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра). – 2012. – Т. 168. – С. 203–219.
49. Чмыр, В.Д. Отношение углерод/хлорофилл *a* как показатель возраста естественных популяций фитопланктона / В.Д. Чмыр, М.И. Сеничева // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2010. – Т. 3, № 44. – С. 305–309.
50. Чурилова, Т.Я. Адаптация морских планктонных водорослей к низким интенсивностям света: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.18 / Чурилова Татьяна Яковлевна. – Севастополь, 1992. – 22 с.
51. Чурилова, Т.Я. О причинах доминирования *Emiliania huxleyi* в фитопланктоне глубоководной части Черного моря в начале лета / Т.Я. Чурилова, В.В. Суслин // Екологічна безпека прибережної та шельфової зон та комплексне використання ресурсів шельфу. – 2012. – Т. 26, № 2. – С. 195–203.
52. Чурилова, Т.Я. Пигменты микроводорослей / Т.Я. Чурилова, З.З. Финенко, А.И. Акимов // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования / под ред. Ю.Н.

- Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 301–320.
53. Шендерова, Л.В. Деградация пигментов у *Synechocystis aquatilis* в условиях азотного голодания при различной освещенности / Л.В. Шендерова, П.С. Венедиктов // Микробиология. – 1980. – Т. 49, № 6. – С. 906–910.
54. Ahlgren, G. Growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture 2. Dependence of growth constants on temperature / G. Ahlgren // Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen. – 1978. – Vol. 21, no. 1. – P. 88–102.
55. Alves, C.A. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation / C.A. Alves, C.N. Magalhaes, P.R. Barja // Botanical Review. – 2002. – Vol. 68, no. 2. – P. 193–208.
56. Andersen, R.A. Algal culturing techniques / R.A. Andersen. – New York : Elsevier Academic Press, 2005. – 578 p.
57. Anderson, S.M. Effects of light intensity on nitrate and nitrate uptake and excretion by *Chaetoceros curvisetus* / S.M. Anderson, O.A. Roels // Marine Biology – 1981. – Vol. 62. – P.257–261.
58. Anning, T. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum* / T. Anning, H.L. MacIntyre, S.M. Platt, P.J. Sammes, S. Gibb, R.J. Geider // Limnology and Oceanography. – 2000. – Vol. 45. – P. 1807–1817.
59. Antal, T.K. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris* / T.K. Antal, H. Mattila, M. Hakala-Yatkin, T. Tuystjärvi, E. Tuystjärvi // Planta. – 2010. – Vol. 232, no. 4. – P. 887–898.
60. Baird, M.E. A dynamic model of the cellular carbon to chlorophyll ratio applied to a batch culture and a continental shelf ecosystem / M.E. Baird, P.J. Ralph, F. Rizwi, K. Wild-Allen, A.D. Steven // Limnology and Oceanography. – 2013. – Vol. 58, iss. 4. – P. 1215–1226.
61. Behrenfeld, M. Carbon-based ocean productivity and phytoplankton physiology from space / M. Behrenfeld, E. Boss, D.A. Siegel, D.M. Shea // Global Biogeochemical Cycles. – 2005. – Vol. 19, iss. 1. – GB1006.

62. Bellacicco, M. Influence of photoacclimation on the phytoplankton seasonal cycle in the Mediterranean Sea as seen by satellite / M. Bellacicco, G. Volpe, S. Colella, J. Pitarch, R. Santoleri // *Remote Sensing of Environment*. – 2016. – Vol. 184. – P. 595–604.
63. Ben-Amotz, A. Mode of action of the massively accumulated  $\beta$ -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation / A. Ben-Amotz, V. Shaish, M. Avron // *Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 91. – P. 1040–1043.
64. Berges, J.A. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) / J.A. Berges, D.E. Varela, P.J. Harrison // *Marine Ecology Progress Series*. – 2002. – Vol. 225. – P. 139–146.
65. Blackford, J.C. Ecosystem dynamics at six contrasting sites: A generic modelling study / J.C. Blackford, J.I. Allen, F.J. Glibert // *Journal of Marine Systems*. – 2004. – Vol. 52. – P. 191–215.
66. Briantais, M. The effects of low temperature acclimation and photoinhibitory treatments on Photosystem 2 studied by thermoluminescence and fluorescence decay kinetics / M. Briantais, M. Ducruet, M. Hodges, G.H. Krause // *Photosynthesis Research*. – 1992. – Vol. 31. – P. 1–10.
67. Bricaud, A. Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains / A. Bricaud, A. Morel, L. Prieur // *Limnology and Oceanography*. – 1981. – Vol. 26, iss. 1. – P. 43–53.
68. Carpenter, E.J. Intraspecific differences in nitrate half-saturation constants for three species of marine phytoplankton / E.J. Carpenter, R.R.L. Guillard // *Ecology*. – 1971. – Vol. 52. – P. 183–185.
69. Chan, A.T. Comparative physiological study of marine diatoms and dinoflagellates in relation to irradiance and cell size. I. Growth under continuous light / A.T. Chan // *Journal of Phycology*. – 1978. – Vol. 14, iss. 4. – P. 396–402.

70. Chow, W.S. Photosystem II function and herbicide binding sites during photoinhibition of chloroplasts in-vivo and in-vitro / W.S. Chow, C.B. Osmond, L.K. Huang // *Photosynthesis Research*. – 1989. – Vol. 21. – P. 17–26.
71. Churilova, T. Light absorption by phytoplankton in the upper mixed layer of the Black Sea: seasonality and parametrization / T. Churilova, V. Suslin, O. Krivenko, T. Efimova, N. Moiseeva, V. Mukhanov, L. Smirnova // *Frontiers in Marine Science*. – 2017. – Vol. 4, art. no. 90 (14 p.).
72. Claquin, D.R. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae / D.R. Claquin, I. Probert, S. Lefebvre, B. Veron // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2008. – Vol. 51. – P. 1–11.
73. Clark, D.R. Growth rate relationships to physiological indices of nutrient status in marine diatoms / D.R. Clark // *Journal of Phycology*. – 2001. – Vol. 37, iss. 2. – P. 249–256.
74. Cloern, J.E. An empirical model of the phytoplankton chlorophyll: carbon ratio - the conversion between productivity and growth / J.E. Cloern, C. Grenz, L. Videgar-Lucas // *Limnology and Oceanography*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1310–1313.
75. Davison, I.R. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. Minireview / I.R. Davison // *Journal of Phycology*. – 1991. – Vol. 27. – P. 2–8.
76. Dickman, E.M. Interactive effects of light and nutrients on phytoplankton stoichiometry / E.M. Dickman, M.J. Vanni, M.J. Horgan // *Oecologia*. – 2006. – Vol. 149, iss. 4. – P. 676–689.
77. Dodds, W.K. Nutrient dilution and removal bioassays to estimate phytoplankton response to nutrient control / W.K. Dodds, E.A. Strauss, R. Lehmann // *Archiv für Hydrobiologie*. – 1993. – Vol. 128. – P. 467–481.
78. Droop, M.R. Vitamin B12 and marine ecology IV. Kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri* / M.R. Droop // *Journal of the Marine Biological Association UK*. – 1968. – Vol. 48. – P. 689–733.

79. Dugdale, R.C. Nutrient limitation in the sea: dynamics, identification and significance / R.C. Dugdale // *Limnology and Oceanography*. – 1967. – Vol. 12. – P. 685–695.
80. Edwards, K.F. Light and growth in marine phytoplankton: allometric, taxonomic, and environmental variation / K.F. Edwards, M.K. Thomas, C.A. Klausmeier, E. Litchman // *Limnology and Oceanography*. – 2015. – Vol. 60, iss. 2. – P. 540–552.
81. Edwards, K.F. Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton / K.F. Edwards, M.K. Thomas, C.A. Klausmeier, E. Litchman // *Limnology and Oceanography*. – 2012. – Vol. 57. – P. 554–566.
82. Eppley, R.W. Temperature and phytoplankton growth in the sea / R.W. Eppley // *Fishery Bulletin*. – 1972. – Vol. 70. – P. 1063–1085.
83. Eppley, R.W. Half-saturation constants for uptake of nitrate and ammonium by marine phytoplankton / R.W. Eppley, J.N. Rogers, J.J. McCarthy // *Limnology and Oceanography*. – 1969. – Vol. 14. – P. 912–920.
84. Falkowski, P.G. Aquatic Photosynthesis. First edition / P.G. Falkowski, J.A. Raven. – Malden, Massachusetts : Blackwell Science, 1997. – 375 p.
85. Falkowski, P.G. Growth-irradiance relationships in phytoplankton / P.G. Falkowski, Z. Dubinsky, K. Wyman // *Limnology and Oceanography*. – 1985. – Vol. 30, iss. 2. – P. 311–321.
86. Falkowski, P.G. Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton / P.G. Falkowski, T.G. Owens // *Plant Physiol*. – 1980. – Vol. 66. – P. 592–595.
87. Falkowski, P.G. Aquatic photosynthesis. Second edition / P.G. Falkowski, J.A. Raven. – Princeton : Princeton University Press, 2007. – 484 p.
88. Fawley, M.W. Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) / M.W. Fawley // *Journal of Phycology*. – 1984. – Vol. 20. – P. 67–72.
89. Finenko, Z.Z. Phytoplankton carbon to chlorophyll *a* ratio: response to light, temperature and nutrient limitation / Z.Z. Finenko, N. Hoepffner, R. Williams,

- S.A. Piontkovski // *Morskoj Ecologicheskij Zhurnal*. – 2003. – Vol. 2, no. 2. – P. 40–64.
90. Finkel, Z.V. Light absorption and size scaling of light limited metabolism in marine diatoms / Z.V. Finkel // *Limnology and Oceanography*. – 2001. – Vol. 46. – P. 86–94.
91. Flynn, K.J. Modelling multi-nutrient interactions in phytoplankton; balancing simplicity and realism / K.J. Flynn // *Progress in Oceanography*. – 2003. – Vol. 56. – P. 249–279.
92. Flynn, K.J. A mechanistic model for describing dynamic multi-nutrient, light, temperature interactions in phytoplankton / K.J. Flynn // *Journal of Plankton Research*. – 2001. – Vol. 23. – P. 977–997.
93. Fujiki, T. Variability in chlorophyll *a* specific absorption coefficient in marine phytoplankton as a function of cell size and irradiance / T. Fujiki, S. Taguchi // *Journal of Plankton Research*. – 2002. – Vol. 24, iss. 9. – P. 859–874.
94. Fujimoto, N. Nutrient-limited growth of *Microcystis aeruginosa* and *Phormidium tenue* and competition under various N:P supply ratios and temperatures / N. Fujimoto, R. Sudo, N. Sugiura, Y. Inamori // *Limnology and Oceanography*. – 1997. – Vol. 42, iss. 2. – P. 250–256.
95. Gallegos, C.L. Photosynthetic parameters of arctic marine phytoplankton: vertical variations and time scales of adaptation / C.L. Gallegos, T. Platt, W.G. Harrison, B. Irwin // *Limnology and Oceanography*. – 1983. – Vol. 28, iss. 4. – P. 698–708.
96. Garciaferris, C. Correlated biochemical and ultrastructural changes in nitrogen starved *Euglena gracilis* / C. Garciaferris, A. Delosrios, C. Ascaso, J. Moreno // *Journal of Phycology*. – 1996. – Vol. 32. – P. 953–963.
97. Geider, R.J. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll "a" ratio in microalgae and cyanobacteria: implication for physiology and growth of phytoplankton / R.J. Geider // *New Phytologist*. – 1987. – Vol. 106, iss. 1. – P. 1–34.
98. Geider, R.J. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation / R.J. Geider, H.L.

- MacIntyre, L.M. Graziano, R.M.L. McKay // *European Journal of Phycology*. – 1998. – Vol. 33, iss. 4. – P. 315–332.
99. Geider, R.J. A dynamic model of phytoplankton growth and acclimation responses of the balanced growth rate and the chlorophyll *a*: carbon ratio to light, nutrient - limitation and temperature / R.J. Geider, H.L. MacIntyre, T.M. Kana // *Marine Ecology Progress Series*. – 1997. – Vol. 148. – P. 187–200.
100. Geider, R.J. Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: a synthesis / R.J. Geider, T. Platt, J.A. Raven // *Marine Ecology Progress Series*. – 1986. – Vol. 30. – P. 93–104.
101. Geider, R.J. Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis / R.J. Geider, J. La Roche // *European Journal of Phycology*. – 2002. – Vol. 37, iss. 1. – P. 1–17.
102. Geider, R.J. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* to nitrate, phosphate, or iron starvation / R.J. Geider, J. Roche, R. Greene, M. Olaizola // *Journal of Phycology*. – 1993. – Vol. 29. – P. 755–766.
103. Geider, R.J. Light absorption, photosynthesis and growth of *Nannochloris atomus* / R.J. Geider, B.A. Osborne // *Marine Biology*. – 1986. – Vol. 93. – P. 351–360.
104. Glibert, P.M. Primary productivity and pelagic nitrogen cycling / P.M. Glibert // *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments* / Eds: T.H. Blackburn, J. Sorensen. – New York : Wiley, 1988. – P. 3–31.
105. Goericke, R. Response of Sargasso Sea phytoplankton biomass, growth rates and primary production to seasonally varying physical forcing / R. Goericke, N.A. Welschmeyer // *Journal of Plankton Research*. – 1998. – Vol. 20, iss. 12. – P. 2223–2249.
106. Goldman, J.C. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters / J.C. Goldman, J.J. McCarthy, D.G. Peavey // *Nature*. – 1979. – Vol. 279. – P. 210–215.
107. Guerrini, F. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation / F. Guerrini, M. Cangini, L. Boni, P. Trost, R. Pistocchi // *Journal of Phycology*. – 2000. – Vol. 36. – P. 882–890.

108. Hagen, C. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris*. III. Action as a «sunshade» / C. Hagen, W. Braune, W. Bjorn // Journal of Phycology. – 1994. – Vol. 30, iss. 2. – P. 241–248.
109. Halsey, K.H. Phytoplankton strategies for photosynthetic energy allocation / K.H. Halsey, B.M. Jones // Annual Review of Marine Science. – 2015. – Vol. 7. – P. 265–297.
110. Han, P. Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model / P. Han, M. Virtanen, J. Koponen, M. Straskraba // Journal of Plankton Research. – 2000. – Vol. 22, №5. – P. 865–885.
111. Harrison, W.G. The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations / W.G. Harrison, L.R. Harris, B.D. Irwin // Limnology and Oceanography. – 1996. – Vol. 41. – P. 16–32.
112. Harrison, P.J. Marine diatoms grown in chemostats under silicate or ammonium limitation. III. Cellular chemical composition and morphology of *Chaetoceros debilis*, *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira gravid* / P.J. Harrison, H.L. Conway, R.W. Holmes, C.O. Davis // Marine Biology. – 1977. – Vol. 43. – P. 19–31.
113. Harrison, P.J. Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture / P.J. Harrison, C.L. Hurd // Cahiers de Biologie Marine. – 2001. – Vol. 42, no. 1–2. – P. 71–82.
114. Hendrey, G.A. The degradation of chlorophyll: a biological enigma / G.A. Hendrey, F. Houghton, S.B. Brown // New Phytologist. – 1987. – Vol. 107. – P. 255–302.
115. Herzig, R. Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies / R. Herzig, P.G. Falkowski // Journal of Phycology. – 1989. – Vol. 25. – P. 462–471.
116. Jeffrey, S.W. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton / S.W. Jeffrey, G.F.

- Humphrey // *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. – 1975. – Vol. 167. – P. 191–194.
117. Kirk, J.T.O. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems / J.T.O. Kirk. – Cambridge : Cambridge University Press, 1986. – 401 p.
118. Kolber, Z. Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II / Z. Kolber, J. Zehr, P. Falkowski // *Plant Physiology*. – 1988. – Vol. 88, iss. 3. – P. 923–929.
119. Krause, H. On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II / H. Krause, S. Somersalo, E. Zumbach, B. Weyers, H. Laasch // *Journal of Plant Physiology*. – 1990. – Vol. 136. – P. 472–479.
120. Krivenko, O.V. Basic characteristics of biotic nitrogen cycle in the open western part of the Black Sea / O.V. Krivenko, Z.P. Burlakova, L.V. Eremeeva // *Ecosystem modeling as a management tool for the Black Sea* / Eds: L.I. Ivanov, T. Oguz. – Dordrecht ; Boston : Kluwer Academic Publishers, 1998. – P. 121–136.
121. Kudo, I. Combined effect of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) / I. Kudo, M. Miyamoto, Y. Noiri, Y. Maita // *Journal of Phycology*. – 2000. – Vol. 36. – P. 1096–1102.
122. Kviderova, J. The cultivation of *Phaeodactylum tricornerutum* in crossed gradients of temperature and light / J. Kviderova, J. Lukavsky // *Algological Studies*. – 2003. – Vol. 110, no 1. – P. 67–80.
123. Langdon, C. On the cause of the interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. Part 2. A general review / C. Langdon // *Journal of Plankton Research*. – 1988. – Vol. 10. – P. 1291–1312.
124. Langdon, C. On the cause of the interspecific differences in the growth-irradiance relationship for phytoplankton. Part 1. A comparative study of the growth-irradiance relationship of three marine phytoplankton species: *Skeletonema costatum*, *Olisthodiscus luteus* and *Gonyaulax tamarensis* / C. Langdon // *Journal of Plankton Research*. – 1987. – Vol. 9. – P. 459–482.

125. Laws, E.A. Nutrient- and light-limited growth of *Thalassiosira fluviatilis* in continuous culture, with implications for phytoplankton growth in the oceans / E.A. Laws, T.T. Bannister // *Limnology and Oceanography*. – 1980. – Vol. 25. – P. 457–473.
126. Lee, K.H. Nitrate uptake of the red tide dinoflagellate *Prorocentrum micans* measured using a nutrient repletion method: effect of light intensity / K.H. Lee, H.J. Jeong, H.J. Kim, A.S. Lim // *Algae*. – 2017. – Vol. 32, no. 2. – P. 139–153.
127. Li, W.K.W. Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics / W.K.W. Li // *Primary Productivity in the Sea* / Ed. P.G. Falkowsky. – New York : Plenum, 1980. – P. 259–279.
128. Litchman, E. Phytoplankton nutrient competition under dynamic light regimes / E. Litchman, C.A. Klausmeier, P. Bossard // *Limnology and Oceanography*. – 2004. – Vol. 49, no. 4, pt 2. – P. 1457–1462.
129. Litchman, E. Multi-nutrient, multi-group model of present and future oceanic phytoplankton communities / E. Litchman, C.A. Klausmeier, J.R. Miller, O.M. Schofield, P.G. Falkowski // *Biogeosciences*. – 2006. – Vol. 3. – P. 585–606.
130. Llewellyn, C.A. Phytoplankton community assemblage in the English Channel: a comparison using chlorophyll *a* derived from HPLC-CHEMTAX and carbon derived from microscopy cell counts / C.A. Llewellyn, J.R. Fishwick, J.C. Blackford // *Journal of Plankton Research*. – 2005. – Vol. 27, iss. 1. – P. 103–119.
131. Lomas, M.W. Interactions between  $\text{NH}^{+4}$  and  $\text{NO}^{-3}$  uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures / M.W. Lomas, P.M. Glibert // *Marine Biology*. – 1999. – Vol. 133, iss. 3. – P. 541–551.
132. Lomas, M.W. Temperature regulation of nitrate uptake: a novel hypothesis about nitrate uptake and reduction in cool-water diatoms / M.W. Lomas, P.M. Glibert // *Limnology and Oceanography*. – 1999. – Vol. 44, iss. 3. – P. 556–572.
133. Long, S.P. Photoinhibition of photosynthesis in nature / S.P. long, S. Humphries, P.G. Falkowski // *Annual Review of Plant Biology*. – 1994. – Vol. 45, iss. 1. – P. 633–662.

134. MacIntyre, H.L. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria / H.L. MacIntyre, T.M. Kana, T. Anning, R.J. Geider // *Journal of Phycology*. – 2002. – Vol. 38. – P. 17–38.
135. Mahalingam, R. Stress response, cell death and signaling: the many faces of reactive oxygen species / R. Mahalingam, N. Fedoroff // *Physiologia Plantarum*. – 2003. – Vol. 119, iss. 1. – P. 56–68.
136. Maldonado, M.T. Influence of N substrate on Fe requirements of marine centric diatoms / M.T. Maldonado, N.M. Price // *Marine Ecology Progress Series*. – 1996. – Vol. 141. – P. 161–172.
137. Mawson, B.T. Thermal acclimation of photosynthetic electron transport activity by thylakoids of *Saxifraga cernua* / B.T. Mawson, R.W. Cummins // *Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 89. – P. 325–332.
138. Methods of seawater analysis / Eds: K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling ; 2nd rev. and extended ed. – Weinheim ; Deerfield Beach, Florida ; Basel : Verlag Chemie, 1983. – 419 p.
139. Mishra, R.K. Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids / R.K. Mishra, G.S. Singhal // *Plant Physiology*. – 1992. – Vol. 98, iss. 1. – P. 1–6.
140. Moisan, J.R. Modelling the effect of temperature on the maximum growth rates of phytoplankton populations / J.R. Moisan, T.A. Moisan, M.R. Abbott // *Ecological Modelling*. – 2002. – Vol. 153, iss. 3. – P. 197–215.
141. Monod, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes / J. Monod. – Paris : Hermann, 1942. – 210 p.
142. Montagnes, D.J.S. Using  $Q_{10}$ : Can growth rates increase linearly with temperature? / D.J.S. Montagnes, S.A. Kimmance, D. Atkinson // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2003. – Vol. 32. – P. 307–313.
143. Montagnes, D.J.S. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms / D.J.S. Montagnes, D.J. Franklin // *Limnology and Oceanography*. – 2001. – Vol. 46. – P. 2008–2018.

144. Morel, F.M.M. Kinetics of uptake and growth in phytoplankton / F.M.M. Morel // Journal of Phycology. – 1987. – Vol. 23. – P. 137–150.
145. Nielsen, M.V. Growth and chemical composition of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium galatheanum* in relation to irradiance, temperature and salinity / M.V. Nielsen // Marine Ecology Progress Series. – 1996. – Vol. 136. – P. 205–211.
146. Nishihara, G.N. Effect of temperature and irradiance on the uptake of ammonium and nitrate by *Laurencia brongniartii* (Rhodophyta, Ceramiales) / G.N. Nishihara, R. Terada, T. Noro // Journal of Applied Phycology. – 2005. – Vol. 17, iss. 5. – P. 371–377.
147. Ohad I. Mechanism of photoinhibition in vivo / I. Ohad, N. Adir, H. Koike, D.J. Kyle, J. Inoue // Biological Chemistry. – 1990. – Vol. 265. – P. 1972–1979.
148. Ottander, C. Photosystem II reaction centres stay intact during low temperature photoinhibition / C. Ottander, T. Hundal, B. Andersson, N.P.A. Huner, G. Öquist // Photosynthesis Research. – 1993. – Vol. 35, iss. 2. – P. 191–200.
149. Platt, T. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblage of marine phytoplankton / T. Platt, C.L. Gallegos, W.G. Harrison // Journal of Marine Research. – 1980. – Vol. 38. – P. 687–701.
150. Popovich, C. Effect of irradiance and temperature on the growth rate of *Thalassiosira curviseriata* Takano (Bacillariophyta), a bloom diatom in Bahia Blanca estuary (Argentina) / C. Popovich, A.M. Gayoso // Journal of Plankton Research. – 1999. – Vol. 21, iss.6. – P. 1101–1110.
151. Post, A.F. Kinetics of light-intensity adaptation in a marine planktonic diatom / A.F. Post, Z. Dubinsky, K. Wyman, P.G. Falkowski // Marine Biology. – 1984. – Vol. 83. – P. 231–238.
152. Ratkowsky, D.A. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range / D.A. Ratkowsky, R.K. Lowry, T.A. McMeekin, A.N. Stokes, R. Chandler // Journal of Bacteriology. – 1983. – Vol. 154, iss. 3. – P. 1222–1226.

153. Raven, J.A. Temperature and algal growth / J.A. Raven, R.J. Geider // *New Phytologist*. – 1988. – Vol. 110, iss. 4. – P. 441–461.
154. Raven, J.A. New light on the scaling of metabolic rate with the size of algae / J.A. Raven, J.E. Kübler // *Journal of Phycology*. – 2002. – Vol. 38, iss. 1. – P. 11–16.
155. Reay, D.S. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria / D.S. Reay, D.B. Nedwell, J. Priddle, J.C. Ellis-Evans // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – Vol. 65, iss. 6. – P. 2577–2584.
156. Redfield, A.C. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton / A.C. Redfield // James Johnstone memorial volume. [Liverpool] : University Press of Liverpool, 1934. – P. 176–192.
157. Rhee, G.Y. The effect of environmental factors on phytoplankton growth: temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation / G.Y. Rhee, I.J. Gotham // *Limnology and Oceanography*. – 1981. – Vol. 26, iss. 4. – P. 635–648.
158. Richardson, K. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies / K. Richardson, J. Beardall, J.A. Raven // *New Phytologist*. – 1983. – Vol. 93, iss. 2. – P. 157–191.
159. Richter, M. Studies on the mechanism of Photosystem II photoinhibition. II. The involvement of toxic oxygen species / M. Richter, W. Ruhle, A. Wild // *Photosynthesis Research*. – 1990. – Vol. 24. – P. 237–243.
160. Riegman, R. Nutrient uptake and alkaline phosphatase (EC 3:1:3:1) activity of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) during growth under N and P limitation in continuous cultures / R. Riegman, W. Stolte, A.A.M. Noordeloos, D. Slezak // *Journal of Phycology*. – 2000. – Vol. 36. – P.87–96.
161. Rosenberg, C. Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva sp.* (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates / C. Rosenberg, J. Ramus // *Marine Biology*. – 1982. – Vol. 66, iss. 3. – P. 251–259.

162. Sakshaug, E. A steady state description of growth and light absorption in the marine planktonic diatom *Skeletonema costatum* / E. Sakshaug, K. Andresen, D.A. Kiefer // *Limnology and Oceanography*. – 1989. – Vol. 34. – P. 198–205.
163. Sarthou, G. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review / G. Sarthou, K.R. Timmermans, S. Blain, P. Treguer // *Journal of Sea Research*. – 2005. – Vol. 53, iss. 1. – P. 25–42.
164. Sathyendranath, S. Carbon-to-chlorophyll ratio and growth rate of phytoplankton in the sea / S. Sathyendranath, V. Stuart, A. Nair, K. Oka, T. Nakane, H. Bouman, M.H. Forget, H. Maass, T. Platt // *Marine Ecology Progress Series*. – 2009. – Vol. 383. – P. 73–84.
165. Schofield, O. Impact of temperature on photosynthesis in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium fundyense* / O. Schofield, J. Grzymiski, M.A. Moline, R.V. Jovine // *Plankton Research*. – 1998. – Vol. 20. – P. 1241–1258.
166. Schwaderer, A.S. Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton / A.S. Schwaderer, K. Yoshiyama, P. de Tezanos Pinto, N.G. Swenson, C.A. Klausmeier, E. Lichman // *Limnology and Oceanography*. – 2011. – Vol. 56, iss. 2. – P. 589–598.
167. Shelef, G. Assaying algal growth with respect to nitrate concentration by a continuous flow turbidostat / G. Shelef, W.J. Oswald, C.C. Goluece // *5th Proc. Int. Conf. Water Pollution Research* / Ed. S.H. Jenkins. – Oxford : Pergamon, 1971. – III-25/1-9.
168. Sinclair, G.A. Environmental and behavioral influences on *Karenia Brevis'* nitrate uptake : MS Thesis / G. A. Sinclair. – Raleigh : North Carolina State University, 2005. – 83 p.
169. Sinclair, G.A. Nitrate uptake by *Karenia brevis*. I. Influences of prior environmental exposure and biochemical state on diel uptake of nitrate / G.A. Sinclair, D. Kamykowski, E. Milligan, B. Schaeffer // *Marine Ecology Progress Series*. – 2006. – Vol. 328. – P. 117–124.
170. Sjoberg, S.A. A Mathematical and Conceptual Framework for Models of the Pelagic Ecosystems of the Baltic Sea / S.A. Sjoberg. – Stockholm, Sweden :

- University of Stockholm, 1980. – 105p. – (Contributions from the Askö Laboratory ; vol. 27).
171. Smit, A.J. Nitrogen uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): adaptations to a temporally variable nitrogen environment / A.J. Smit // *Botanica Marina*. – 2002. – Vol. 45, no. 2. – P. 196–209.
  172. Stelmakh, L.V. Carbon-to-chlorophyll-*a* ratio in the phytoplankton of the Black Sea surface layer: variability and regulatory factors / L.V. Stelmakh, T.I. Gorbunova // *Ecologica Montenegrina*. – 2018. – Vol. 17. – C. 60–73.
  173. Stramski, D. Effects of temperature, nitrogen, and light limitation on the optical properties of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* / D. Stramski, A. Sciandra, H. Claustre // *Limnology and Oceanography*. – 2002. – Vol. 47, iss. 2. – P. 392–403.
  174. Strzepek, R.F. Influence of irradiance and temperature on the iron content of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) / R.F. Strzepek, N.M. Price // *Marine Ecology Progress Series*. – 2000. – Vol. 206. – P. 107–117.
  175. Talling, I.F. Photosynthetic characteristics of some freshwater plankton diatoms in relation to underwater radiation / I.F. Talling // *New Phytologist*. – 1957. – Vol. 56. – P. 29–50.
  176. Tang, E.P.Y. Why do dinoflagellates have lower growth rates? / E.P.Y. Tang // *Journal of Phycology*. – 1996. – Vol. 32. – P. 80–84.
  177. Taucher, J. Can we predict the direction of marine primary production change under global warming? / J. Taucher, A. Oschlies // *Geophysical Research Letters*. – 2011. – Vol. 38, iss. 2. – L02603.
  178. Terry, K.L. Light-limited growth of two strains of the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin: chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes / K.L. Terry, J. Hirata, E.A. Laws // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 1983. – Vol. 68. – P. 209–227.

179. Thomas, W.H. Effect of interactions between temperature and nitrate supply of cell-division rates to two marine phytoflagellates / W.H. Thomas, A.N. Dodson // *Marine Biology*. – 1974. – Vol. 24. – P. 213–217.
180. Thompson, P.A. Effects of variation in temperature. 1. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton / P.A. Thompson, M. Gou, P.J. Harrison // *Journal of Phycology*. – 1992. – Vol. 28. – P. 481–488.
181. Thompson, P.A. Light-limited growth on ammonium vs. nitrate: What is the advantage for marine phytoplankton? / P.A. Thompson, M.E. Levasseur, P.J. Harrison // *Limnology and Oceanography*. – 1989. – Vol. 34, iss. 6. – P. 1014–1024.
182. Verity, P.G. Effects of temperature, irradiance and daylength on the marine diatom *Leptocylindrus danicus* Cleve / P.G. Verity // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. – 1982. – Vol. 60. – P. 209–222.
183. Villareal, T.A. Biological and chemical characteristics of the giant diatom *Ethmodiscus* (Bacillariophyceae) in the central North Pacific gyre / T.A. Villareal, L. Joseph, M.A. Brzezinski, R.F. Shipe, F. Lipschultz, M.A. Altabet // *Journal of Phycology*. – 1999. – Vol. 35. – P. 896–902.
184. Wallen, D.G. Molybdenum dependence, nitrate uptake and photosynthesis of freshwater plankton algae / D.G. Wallen, L.D. Cartier // *Journal of Phycology*. – 1975. – Vol. 11, iss. 3. – P. 345–349.
185. Yoder, J.A. Effect of temperature on light-limited growth and chemical composition of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) / J.A. Yoder // *Journal of Phycology*. – 1979. – Vol. 15. – P. 362–370.
186. Zonneveld, C. Light-limited microalgal growth: a comparison of modelling approaches / C. Zonneveld // *Ecological Modelling*. – 1998. – Vol. 113, iss. 1. – P. 41–54.