

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

На правах рукописи

Соломонова Екатерина Сергеевна

**ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ
С ПОМОЩЬЮ ЦИТОМЕТРИЧЕСКИХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

Специальность
03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Финенко Зосим Зосимович

Севастополь - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Соотношение живых/мёртвых клеток микроводорослей в культурах и в природных сообществах.....	12
1.2 Методы определения живых и мёртвых клеток водорослей	16
1.2.1 Биохимический метод.....	16
1.2.2 Люминесцентный метод.....	20
1.3 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла <i>a</i> , как экспресс-показатель функционального состояния фитопланктона	21
1.3.1 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла <i>a</i> водорослей в условиях культур.....	22
1.3.2 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла <i>a</i> природных сообществ фитопланктона.....	24
1.4 Подход к оценке физиологического состояния микроводорослей по размерному составу клеток.....	25
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	29
2.1 Объекты исследования.....	29
2.2 Методы проведения экспериментов.....	29
2.2.1 Метод проточной цитометрии.....	29
2.2.2 Метод относительной переменной флуоресценции хлорофилла <i>a</i>	34
2.3 Условия проведения экспериментов.....	37
2.4 Статистическая обработка данных.....	42
2.5 Объем проанализированного материала.....	42
ГЛАВА 3 ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ЖИВЫХ, НЕАКТИВНЫХ И МЁРТВЫХ КЛЕТОК МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ.....	43
3.1 Оценка доли физиологически активных и неактивных клеток в культурах микроводорослей.....	43

3.2 Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста в разных условиях освещенности.....	47
ГЛАВА 4 ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ В КУЛЬТУРАХ.....	59
4.1 Оценка функционального состояния водорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла.....	59
4.2 Исследование изменчивости параметров флуоресценции при различных условиях культивирования <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	66
ГЛАВА 5 ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ПО ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ОБЪЕМА КЛЕТОК.....	76
5.1 Влияние интенсивности света на вариabельность размерного спектра водорослей.....	76
5.2 Влияние температуры на вариabельность размерного спектра водорослей.....	84
ГЛАВА 6 СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПИКО- И НАНОФИТОПЛАНКТОНА В ПРИБРЕЖНЫХ ВОДАХ ЧЕРНОГО МОРЕЯ.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
ВЫВОДЫ.....	110
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	112
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. К важнейшим компонентам водных экосистем относится фитопланктон, как основной первичный продуцент органического вещества, основа всех трофических взаимодействий. Количественная оценка обилия фитопланктона и его функционального состояния требуется для решения целого ряда задач, связанных с оценкой условий формирования, динамики и распределения первичной продукции в море, загрязнения и процессов самоочищения вод, а также, в целом, проблемы биологической продуктивности водоёмов. Планктонные водоросли, продукция которых лежит в основе функционирования всей пелагической пищевой цепи, обладают высокой скоростью воспроизводства и, быстро реагируя на изменения в экосистеме, могут служить чувствительным индикатором воздействия на неё различных факторов [29, 63, 210].

Избыточное накопление биологически ценных веществ в клетках, наблюдаемое в качестве адаптивного ответа водорослей на стрессовые условия роста, делает их перспективным объектом массового промышленного культивирования, а получение максимального выхода описываемых веществ является весьма актуальной биотехнологической задачей ввиду их высокой экономической привлекательности [128, 133]. Однако, существует трудность в постоянном контроле физиологического состояния культивируемого объекта, так как необходимо создать такие стрессовые условия, которые обеспечат максимальный выход ценных веществ, но при этом не приведут к гибели водорослей.

Функциональное состояние водорослей, их продукционный потенциал, чаще всего оценивают с помощью ростовых и фотосинтетических показателей, а также концентрации и соотношения основных внутриклеточных компонентов, в частности - отношений между органическим углеродом и

хлорофиллом *a* (C/Хл) и азотом (C/N) [50, 56, 59]. Определение этих характеристик требует длительных и трудоемких измерительных процедур, и поэтому они не могут служить экспресс-индикаторами в случае рутинных полевых исследований, что затрудняет отслеживание влияния быстротекущих воздействий окружающей среды.

В последнее время активно разрабатываются экспресс-методы оценки функционального состояния фитопланктона и его продукционного потенциала. К таким методам относятся метод проточной цитометрии, использующий различные витальные красители, и метод регистрации показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a* [71, 100, 171, 177]. Вместе с тем, автоматизация цитометрических исследований предъявляет более высокие требования к подготовке проб, условиям окраски их флуорохромами и методике проведения измерений. Недостаточно изучены отличия окраски разных видов водорослей и, соответственно, недостаточно известно, каким образом таксономический состав водорослей в пробе может влиять на эффективность её окрашивания. Для некоторых видов и даже групп микроводорослей (например, диатомовых) получены плохо воспроизводимые результаты [63, 112, 166], что может указывать на некоторые неучтенные факторы, контролирующие гидролиз красителей в клетках.

Метод измерения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* водорослей обладает высокой чувствительностью и позволяет быстро оценить ряд биофизических характеристик фитопланктона в режиме реального времени [100, 116]. Однако до сих пор слабо изученным остается вопрос влияния физических факторов среды на динамику переменной флуоресценции хлорофилла *a* [100, 110]. Несмотря на интенсивные исследования флуоресцентных характеристик, сведения о взаимосвязи относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* с основными структурными внутриклеточными соотношениями водорослей и их скоростью роста практически отсутствуют.

В связи с этим, совершенствование существующих и развитие новых методов прямой детекции стрессового состояния клетки/сообщества водорослей – это актуальная и востребованная прикладная задача, на решение которой направлена данная работа.

Все вышесказанное определило цель настоящих исследований

Цель и задачи исследования. Цель работы - оценить функциональное состояние микроводорослей при оптимальных и экстремальных условиях роста с помощью цитометрических и флуоресцентных показателей.

Для реализации поставленной цели требуется решение следующих **задач**:

1. Разработать методологию применения проточной цитометрии и витального маркера диацетата флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток по функциональной активности.
2. Определить соотношение активных, неактивных и мертвых клеток в монокультурах одноклеточных водорослей в зависимости от условий выращивания с использованием проточного цитометра.
3. Изучить изменчивость флуоресцентных параметров клеток при различных условиях культивирования и оценить возможность их применения для оценки физиологического состояния водорослей.
4. Оценить физиологическое состояние микроводорослей по вариабельности объемов клеток.
5. Апробировать возможность применения предложенных индикаторов (показатель удельной флуоресценции FDA на клетку (FDA_{fl}) и количество жизнеспособных клеток) для оценки функционального состояния пико- и нанофитопланктона в прибрежных районах Черного моря.

Научная новизна. Стандартизирована процедура окрашивания водорослей флуорохромом диацетатом флуоресцеина (FDA) для оценки доли живых, малоактивных и мертвых клеток в культурах водорослей и в пико- и нанофракциях фитопланктона в прибрежных водах Черного моря. Впервые предложено использовать параметр FDA_{fl} для экспресс-контроля функционального состояния клеток водорослей в культурах и в фитопланктонном

сообществе. Обосновано применение относительных показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a* для оценки функционального состояния водорослей в условиях накопительного роста культур и при вариабельности света и температуры от оптимальных до экстремальных уровней. Впервые показана связь коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* с флуоресценцией FDA, ростовыми и структурными параметрами ($C/Xл\ a$, C/N) клеток водорослей.

Выявлена высокая степень неоднородности объёмов клеток водорослей в неблагоприятных условиях среды, что позволяет предложить использовать коэффициент вариации (CV), как косвенный показатель функционального состояния микроводорослей.

Получены новые сведения о сезонной изменчивости биомассы трех размерных фракций микроводорослей (*Synechococcus*, пикозукариотический фитопланктон, нанофитопланктон) в прибрежных водах Черного моря с помощью проточной цитометрии. Впервые для исследуемого района (воды Севастопольской бухты) рассчитан процент живых клеток пико- и нанофитопланктона и установлен характер изменения интенсивности флуоресценции FDA в выделенных размерных группах водорослей, что позволит использовать эти параметры для экспресс-тестирования физиологического состояния фитопланктона.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты дополняют фундаментальные знания об изменчивости физиологического состояния водорослей, как в процессе лабораторного и промышленного культивирования, так и в природных условиях существования фитопланктонного сообщества.

Предложенные в работе экспресс маркеры могут быть использованы для диагностирования стрессового состояния микроводорослей, вызванного воздействием антропогенных факторов или экстремальных условий окружающей среды.

Результаты настоящей работы могут быть включены в комплекс мер контроля санитарно-биологического состояния прибрежных вод и разработку

природно-охранных мероприятий, что будет содействовать обеспечению экологической безопасности региона, поддержанию качества морской среды и качества жизни населения прибрежных территорий, а также могут быть использованы для решения биотехнологических задач при культивировании микроводорослей.

Методы исследования. В работе использовали стандартные методы культивирования микроводорослей, цитофлуориметрический метод с использованием витального красителя FDA, метод измерения относительных показателей переменной флуоресценции хлорофилла *a*, метод световой микроскопии, метод газо-адсорбционного хроматографического анализа на CHN-анализаторе для определения содержания органического углерода и азота в клетках водорослей. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программных пакетов “Microsoft Exel 7.0”, “Statistica-5” и “Grapher-12”.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Применение маркера ферментативной активности диацетата флуоресцеина (FDA) и проточной цитометрии позволяет получить достоверные и воспроизводимые результаты для дифференциации клеток микроводорослей на живую и мертвую компоненту, что делает возможным использовать количество жизнеспособных клеток в качестве экспресс-показателя функционального состояния водорослей.

2. Величина флуоресценции FDA является более консервативным параметром по сравнению с переменной флуоресценцией хлорофилла *a*; значительное снижение значения этого параметра связано с необратимой потерей функциональной активности клеток водорослей и их гибели, что позволяет использовать данный показатель в качестве маркера жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования.

3. Высокая неоднородность объёмов клеток в культурах водорослей свидетельствует об ухудшении их физиологического состояния.

4. Функциональное состояние пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря в годовом цикле характеризуется относительной

стабильностью. Сообщество отвечает на резкие изменения среды сменой видовых комплексов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается значительным объемом собранного и обработанного материала (2340 проб), большим количеством логично спланированных экспериментов, адекватных поставленным целям и задачам, использованием современных методов обработки экспериментальных данных, использованием компьютерных программ статистической обработки цифровых массивов.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на отечественных и международных научных собраниях: международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Понт Эвксинский VI» (г. Севастополь, 21–24 сент. 2009 г.), международной конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Ялта, 21-25 авг. 2010 г.), международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (г. Харьков, 21-25 нояб. 2010г.), международной Пущинской школы – конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» по морской биологии (г. Пущино, 18-22 апр. 2011 г.), международной научно-практической конференции молодых ученых «Понт Эвксинский - 2011» (г. Севастополь, 24-27 мая 2011 г.), международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция» (г. Одесса, 13-17 июня 2011), международном научно-техническом семинаре «Системы контроля окружающей среды -2012» (г. Севастополь, 24-28 сент. 2012), международной конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Щелкино, 18 – 22 июня 2013 г.), международной научно-практической конференции молодых ученых «Понт Эвксинский - 2013» (г. Севастополь, 1-4 окт. 2013 г.), VII школа-семинар для молодых учёных и специалистов «Актуальные проблемы экологической безопасности Азово-Черноморского региона – 2014», посвящённая 85-летию со дня рождения академика Г.Г. Поликарпова (Севастополь, 2 – 6 сент. 2014 года),

международная научно-практическая конференция «Биоразнообразие и устойчивое развитие» (г. Симферополь, 15-19 сент., 2014), International scientific conference in memoriam of the 80th anniversary of professor M. V. Gusev «Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future» (с. Moscow, 27–30 may, 2014), всероссийская научно-практическая конференция «Морские биологические исследования: достижения и перспективы» (г. Севастополь, 19-23 сент. 2016 г.), всероссийская молодежная гидробиологическая конференция «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (п. Борок, 10-13 нояб. 2016 г.), всероссийской научной конференции «Комплексные исследования Мирового океана» (г. Москва, 10-14 апр., 2017 г.).

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Тема, цель, задачи, объект, методы и программа исследования определены автором совместно с научным руководителем. Основной комплекс экспериментальных работ, обобщение, анализ и интерпретация полученных результатов, формулировка выводов и основных защищаемых положений выполнены автором самостоятельно, при направляющем участии научного руководителя.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 26 печатных работ, в том числе 13 научных статей (из них 12 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и ВАК Украины (опубликованные до января 2015 г.) и 4 в изданиях, входящих в Web of Science и SCOPUS), 13 тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения, выводов и списка литературы. Материалы изложены на 139 страницах, содержит 5 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 219 источников, из которых 160 на иностранных языках.

Благодарности. Автор считает своим приятным долгом выразить глубокую благодарность и признательность научному руководителю доктору биологических наук, профессору, руководителю отдела экологической

физиологии водорослей **З. З. Финенко** за помощь в разработке теоретических основ диссертации, руководство и разработку стратегии исследований. Выражаю искреннюю признательность всем сотрудникам отдела экологической физиологии водорослей за постоянное внимание к работе и ценные замечания, за помощь в проведении экспериментов. Особую признательность автор выражает научному сотруднику отдела экологической физиологии водорослей **А. И. Акимову**, руководителю отделом планктона **В. С. Муханову** и младшему научному сотруднику **Н. Ю. Шоман** за совместно выполненную часть исследований, постоянную помощь в проведении экспериментов, научные консультации, ценные замечания и поддержку в написании работы. Автор считает своим долгом выразить признательность младшему научному сотруднику отдела экологической физиологии водорослей **И. М. Мансуровой** за предоставленные данные по содержанию хлорофилла *a* и **Н. Ю. Родионовой** за предоставленные данные по гидрохимии.

Диссертационная работа выполнена в отделе экологической физиологии водорослей и в лаборатории микропланктона Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН в рамках фундаментальных исследований по госбюджетным темам: "Разработка новых подходов для оценки структурных и продукционных характеристик фитопланктонного сообщества и роли физико-химических процессов в их изменчивости" (№ ДР 0107U012022, 2004–2009 гг.); "Комплексная оценка современного состояния и прогнозирования динамики условий морской среды и ресурсов Азово-Черноморского бассейна" (№ ДР 0110U006203, 2010–2014 гг.); "Изучение механизмов адаптации, трансформации и эволюции морских и океанических экосистем в условиях климатических изменений и антропогенного влияния» (№ 1001-2014-0013, 2015–2017), "Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом" (№ 0828-0003 АААА-А18-118021490093-4, 2018–2020), гранта РФФИ 19-34-00388.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Соотношение живых/мёртвых клеток микроводорослей в культурах и в природных сообществах

Чаще всего в случае одноклеточных делящихся микроорганизмов по соотношению содержащихся в них живых и мёртвых клеток можно судить о функционировании популяции в целом, а также об эффективности функционирования клеток *in vivo* и при их культивировании *in vitro* с целью последующего использования клеточных культур.

Соотношение живых и мёртвых клеток в популяции (или любой суспензии клеток) активно используется в практике гидробиологических исследований для контроля биотехнологических процессов [118, 136], в частности, как при лабораторном и промышленном культивировании микроводорослей, так и в исследованиях функциональной активности микробных популяций в природных условиях – например, для оценки степени загрязнения морских вод [77, 95], мониторинга цветения микроорганизмов фитопланктона, в том числе токсичных видов [129], оценки скорости роста и продуктивности фитопланктона [206, 215]. Первые попытки определения живых/мертвых клеток микроводорослей были предприняты более 100 лет назад [77, 189]. Анализ сводился к простому подсчету живых/мертвых клеток водорослей в накопительном режиме культивирования. Минимальный процент мёртвых клеток наблюдали в экспоненциальной фазе роста при оптимальных условиях окружающей среды, и последующее увеличение процента мертвых клеток при переходе культур в стационарную фазу роста [189]. Однако доля мёртвых клеток в стационарной фазе существенно различалась между видами, культивируемыми в идентичных условиях, что свидетельствует о различной степени жизнестойкости самих водорослей или о возможной количественной ошибке, связанной непосредственно с используемыми в работах

методами [63, 162]. Так, доля мёртвых клеток в стационарной фазе роста у более десяти видов микроводорослей составила порядка 80 %, однако, у *Thalassiosira* sp.- 35 % [63], для *Amphidinium carterae* - от 10 до 25 % [102]. Увеличение количества мёртвых клеток и потеря функциональной активности культуры *Scenedesmus quadricauda* отмечались [29] в стационарной фазе, когда происходило снижение обеспеченности водорослей питательными веществами до уровня, при котором рост клеток останавливался. Одним из факторов, оказывающим негативное воздействие на состояние клеток в стационарной фазе, может являться их чрезмерная плотность, при которой возможны эффекты самоинтоксикации. Отрицательное влияние на физиологическое состояние *Phaeodactylum tricornutum* оказывали метаболиты, выделяемые культурой в стационарной фазе роста. Ингибирование роста метаболитами было обнаружено и для других диатомовых водорослей, а также для культур рода *Chlorella* [3].

При оценке функционального состояния природного фитопланктона было установлено, что соотношение живые/мёртвые организмы варьирует от вида к виду, в процессе сезонной динамики, при этом до 35 % общей биомассы микроводорослей может быть нежизнеспособна [66, 206]. Сезонная вариабельность доли живых клеток пикопланктона (*Prochlorococcus* и *Synechococcus*) от 5 до 60 % выявлена [63] в бухте Blanes (Средиземное море), при этом определяющим фактором, по мнению авторов, была температура. Изменение процента живых клеток цианобактерий в течение летнего периода наблюдали в Средиземном море [61]: он увеличивался от 35 % - в начале июня, до 100 % в августе, когда на фоне высокой скорости роста в популяции преобладали делящиеся клетки. На отсутствие сезонной динамики доли живых клеток криптофит указывают результаты работы [195]: соотношение между живыми и мёртвыми клетками криптофитовых микроводорослей в Elkhorn Slough (залив Монтерей) мало зависело от сезона и составляло весной и зимой 60 % и 70 % соответственно. В пробах воды из северной части Атлантического океана доля живых клеток фитопланктона изменялась с глубиной и между таксонами: от 50 % до 95 % [206].

Кроме того, имеются сведения, что соотношение живых и мёртвых клеток водорослей рода *Prochlorococcus* и *Synechococcus* связано с наличием питательных веществ в среде: оно было ниже в олиготрофных водах, по сравнению с регионами, подверженными влиянию экваториального апвеллинга в центральной части Атлантического океана [69, 151].

Вариабельность количества живых и мертвых клеток может быть связана с видоспецифичностью доминирующих в момент отбора пробы видов [66, 69]. Так увеличение жизнеспособности популяции может быть результатом адаптации и достигаться за счет того, что некоторые группы водорослей могут избегать фотоингибирования при воздействии света высокой интенсивности [115, 183], или азотного голодания, вследствие особенностей внутриклеточной ассимиляции его соединений. У *Prochlorococcus marinus* наблюдали более высокий процент мёртвых клеток при воздействии света высокой интенсивности в условиях лимитирования роста биогенными элементами, по сравнению с видом пикозукариот *Ostreococcus sp. strain RCC 410* и нанопланктонной водорослью *Thalassiosira oceanica*, выращенных в тех же условиях [145].

Основные причины, приводящие к появлению мертвых клеток водорослей (не связанные с выеданием) выступают седиментация и непосредственная деструкция самих клеток, как в процессе их естественного роста [103], так и в результате действия факторов окружающей среды: дефицит питательных веществ, низкая освещённость и температура [78, 80].

При наступлении естественного апоптоза у микроводорослей часть биомассы переходит в растворённое органическое вещество, образование которого является результатом процессов лизиса клеток фитопланктона, в связи, с чем возникает сложность в идентификации мёртвых клеток водорослей. Лизис клеток фитопланктона связан с разрушением цитоплазматических мембран клеток и высвобождением протоплазмы и клеточных органелл во внешнюю среду. Скорость разрушения клеток и последующая дезинтеграция и растворение клеточных структур может быть обусловлена как видовой спецификой, так и действием абиотических и биотических факторов среды.

Увеличение количества мертвых клеток *Phaeocystis* в Северном море вызывалось разрушением самих клеток [83, 205] после цветения. Высокие скорости клеточного лизиса водорослей отмечались летом в глубоководной части океана [64] и в прибрежных водах [65].

Анализ функционального состояния фитопланктона на основе подсчета живых/мёртвых клеток практически не проводился для сообществ Черного моря. В литературе имеются данные лишь для отдельных видов водорослей [46, 43].

Что считать объективным дифференцирующим критерием для распознавания живых и мёртвых клеток водорослей? Практически для этого могут служить любые признаки живого: способность клеток к делению, подвижность, проявление метаболической активности, ферментативные свойства, состояние барьера проницаемости клеточных мембран, накопление АТФ, морфологические признаки.

На сегодняшний день вопрос идентификации живых и мертвых клеток в исследуемом материале и их соотношение остается достаточно сложной и плохо изученной проблемой. Общим и основным недостатком существующих подходов является отсутствие объективного критерия для отличия живых микроорганизмов от мертвых из-за наличия большого числа промежуточных форм [6, 44].

В рамках современной морской гидробиологии выделяют два основных метода определения живых и мертвых клеток микроводорослей:

- биохимический;
- люминесцентный.

1.2 Методы определения живых и мёртвых клеток водорослей

1.2.1 Биохимический метод

Мембранная целостность - наиболее экспрессный, удобный и популярный у цитобиологов маркер живых клеток водорослей [82], так как одна из основных особенностей, отличающих живые клетки от мёртвых, - потеря транспортной функции через их цитоплазматическую мембрану. Для оценки мембранной целостности клетки используют свойство некоторых флуорохромов проникать через мембраны клеток, окрашивая внутриклеточные структуры в соответствующий цвет [95, 189]. Такой метод определения живых клеток получил название «биохимический метод».

Красители стали применять с начала девятнадцатого века для дифференциального окрашивания живых и мёртвых клеток животных и растений. Сущность метода состоит в том, что некоторые виды флуорохромов проникают через поврежденную оболочку мёртвых клеток и окрашивают цитоплазму последних. В то же время живые клетки с ненарушенной избирательностью мембраны не пропускают краситель и остаются бесцветными. Или, наоборот, другие красители окрашивают только живые и активные клетки, при этом мёртвые остаются бесцветными.

При биохимическом подходе в исследованиях микроводорослей для маркирования живых клеток широко применяется метод окраски диацетатом флуоресцеина (FDA) [77, 166], одного из старейших методов обнаружения живых и мёртвых микроорганизмов, использование которого в научных исследованиях началось почти 50 лет назад [185]. В состав FDA входит субстрат, специфичный к ферментам группы эстераз [96]. Эстеразы – цитоплазматические ферменты, осуществляющие гидролиз сложных эфиров на спирты и кислоты при участии молекул воды, принадлежат к классу гидролаз. Существуют различные типы

эстераз, которые функционируют в широком диапазоне биологических процессов [34]. В клетках водорослей они имеют большое значение для оборота фосфолипидов в мембранах. Эстеразы присутствуют во всех живых или недавно умерших морских организмах, и поэтому измерение эстеразы может быть использовано для дифференциации на живые или мёртвые организмы [96].

Ферментный гидролиз диацетат флуоресцеина приводит к высвобождению молекулы флуоресцеина и, как следствие, к свечению клетки (эмиссия в зелёной области спектра), как показано на рисунке 1.

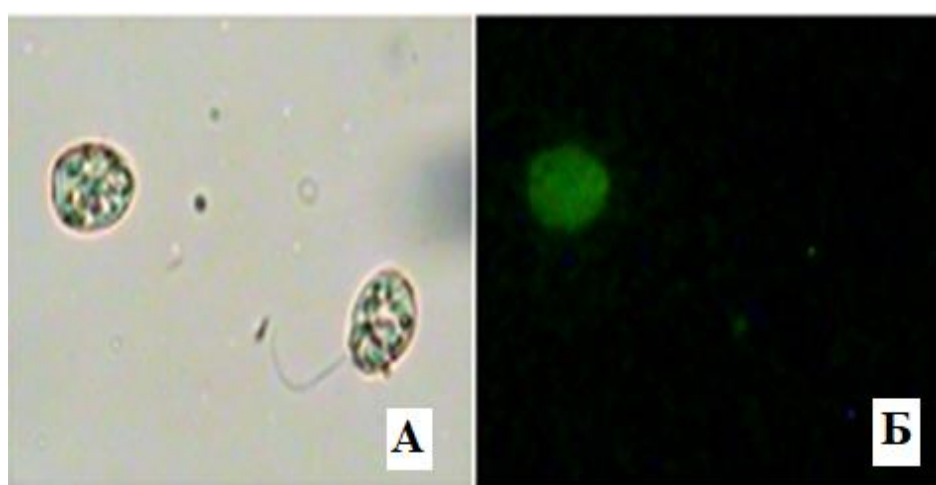


Рисунок 1 – Две клетки *Prorocentrum micans* (А), одна из которых флуоресцирует после окраски FDA (Б). Проба фитопланктона, июль 2009 г. (фото В.С. Муханов)

Таким образом, FDA является маркером ферментативной активности в живых клетках, а интенсивность его флуоресценции пропорциональна физиологической активности каждой из исследуемых клеток [96].

Такой «индивидуальный подход» в окраске FDA оказался исключительно эффективен в проточной цитометрии. Этим и объясняется быстрый рост числа работ, в которых окраску FDA комбинировали с проточной цитометрией для точного определения доли живых/мёртвых клеток различных таксономических групп водорослей, как в процессе их накопительного роста при оптимальных условиях среды, так и при воздействии различного рода факторов среды [80, 96,

111, 165, 194, 213]. Перспективность этого подхода связана, в первую очередь, с высокой производительностью и точностью проточной цитометрии.

Однако существует ряд трудностей в использовании FDA. В первую очередь - это отсутствие единого протокола окрашивания, время инкубации у разных авторов колеблется от нескольких часов [215], до 3–7 минут [195]. Считается, что при минимальном воздействии красителя на клетки водорослей сводится к минимуму возможное его негативное действие. Установлено токсическое действие FDA на клетки водорослей [133]. Всё это хорошо объясняет частое несовпадение данных витального окрашивания и других методов оценки функционального состояния микроорганизмов [27].

В литературе практически не затрагиваются вопросы оценки роли основных физических факторов (температура и освещенность) в регулировании процессов, связанных с деятельностью внутриклеточных эстераз микроводорослей [114]. Встречаются единичные исследования, где изменения активности ферментов группы эстераз у водорослей рассматривали как отклик на действие токсических веществ. В основном это краткосрочные опыты, не связанные с длительным культивированием водорослей в ингибируемой среде [105, 174, 178]. Резкое падение активности внутриклеточных эстераз отмечено у *Chlamydomonas moewusii* и *Chlorella vulgaris* сразу после воздействия на клетки культур низких концентраций любого из испытуемых химических веществ [181]. При исследовании влияния меди на *Selenastrum capricornutum* зарегистрировано резкое падение активности эстераз водорослей лишь при высокой концентрации меди, однако после 27 часов адаптации культуры, активность эстераз имела высокие значения, безотносительно к содержанию меди в среде [73].

На базе использования метода проточной цитометрии в сочетании с FDA показаны две, различающиеся между собой, стратегии устойчивости различных видов динофитовых водорослей при выращивании их в темновом режиме. У одной группы динофлагелят наблюдали снижение активности внутриклеточных эстераз при адаптации водорослей к темноте и последующее восстановление данного параметра после переноса на свет. Для другой группы водорослей было

характерно отсутствие изменений метаболической активности в темноте, но и невозможность восстановления роста при последующем воздействии на них оптимальной интенсивности света [136].

Следует отметить, что величина флуоресценции при окраске внутриклеточных эстераз, зависит не только от функционального состояния клеток водорослей, но и от концентрации самого красителя добавляемого в пробу, времени окрашивания, pH среды и т.д. [133]. Спорным остаётся момент несвойственного водорослям увеличения FDA флуоресценции при воздействии стрессовых факторов среды. Действие высоких концентраций кадмия и параквата на *Chlamydomonas moewusii* приводило к увеличению активности эстераз в 2,5 раза по сравнению с контролем в первые сутки проведения эксперимента [180], при акклимации *Microcystis aeruginosa* к температуре 10 °C также отмечен резкий рост FDA флуоресценции [148]. Также одним из недостатков использования диацетатафлуоресцеина является сложность его применения в природных пробах (без видовой дифференциации), так как в результате окрашивания FDA возникает ошибка в анализе физиологического состояния водорослей, которые могут иметь "фоновую флуоресценцию" в зеленой области спектра 515 - 530 нм (FDA - 525нм) или так называемую «неспецифическую зеленую автофлуоресценцию». Наложение спектров GAF и флуорохрома может служить источником артефактов, причиной недостоверности получаемых данных [202].

Кроме того, степень окрашенности организмов в пробе может сильно варьировать, и, как следствие этого, слабо окрашенные клетки трудно классифицировать как однозначно живые или мёртвые. Это касается обработки биоматериала под микроскопом. Возможно, данные клетки находятся в малоактивном (покоящемся) состоянии. По современным представлениям, покоящиеся клетки — это клетки, неспособные к непрерывному клеточному делению, требующемуся для роста в среде, но при этом большинство клеток сохраняют свою жизнеспособность при наступлении более благоприятных условий [125]. Таким образом, возможно, возникнет ошибка в классификации организмов на живые и мёртвые с применением FDA, так как изложенный выше

подход может привести к затруднению в идентификации принадлежности организма со спорной окраской к той или иной категории. [113].

Немаловажный фактор – это стоимость маркеров и то, что обработка проб должна быть произведена в относительно короткое время, желательно – в день отбора и окраски, либо в ближайшие дни.

1.2.2 Люминесцентный метод

Техника использования люминесцентной микроскопии для диагностики физиологического состояния водорослей была разработана Горюновой С.В. [14, 15]. Этот метод основан на том, что при микроскопировании водорослей в ультрафиолетовых лучах клетки, различающиеся по своему физиологическому состоянию, дают различные по окраске и яркости оттенки свечения. Живые клетки водорослей имеют ярко-красную флуоресценцию. Иного типа свечение характерно для отмирающих и мертвых клеток. Особенно разнообразная гамма световых переходов у отмирающих клеток. Изменение спектра свечения клеток водорослей от живых к мертвым происходит по следующим фазам: 1) ярко-красное; 2) тускло-бордовое или розово-красное; 3) оранжево-розовое; 4) голубовато-зеленое; 5) оливково-зеленое.

Яркое пурпурно-красное свечение характерно для хлорофилл содержащих высоко жизнеспособных клеток, находящихся в активном состоянии, интенсивно делящихся или готовых к делению (в логарифмической фазе роста). Красное свечение меньшей яркости характерно для клеток водорослей в стационарной фазе роста. Тускло-красным цветом светятся старые клетки с ослабленной жизненной активностью. Голубовато-зеленое и оливково-зеленое свечение характерно для мертвых клеток и детрита. Промежуточные оттенки характерны для различных степеней отмирания клеток [17]. Этот метод позволяет из общей численности клеток, определенной методом прямого подсчета, выделить фракцию мертвых клеток. Основным недостатком этой методики является то, что она не дает

возможность непосредственного определения смертности клеток, а отражает лишь результат этого процесса из-за неизвестной продолжительности лизиса отмерших клеток [29].

1.3 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a*, как экспресс-показатель функционального состояния фитопланктона

Для быстрой диагностики функционального состояния фитопланктона, в частности, оценки его фотосинтетической активности в последние двадцать пять лет в мировой гидробиологической практике успешно используют метод регистрации переменной флуоресценции хлорофилла *in vivo* [37].

Теоретически разработаны и используются измерения переменной флуоресценции после ингибирования реакционных центров фотосистемы 2 (ФС 2) с помощью ДЦМУ [3-(3, 4 dichlorophenyl) 1, 1 - dimethylurea] или насыщающими реакционные центры вспышками света [45]. Величина переменной флуоресценции (F_v/F_m) является параметром, характеризующим эффективность переноса энергии света в первичных фотохимических процессах (максимальный квантовый выход разделения зарядов фотосистемы 2) [30]. Эта величина является чувствительным показателем функционального состояния водорослей [37, 116, 141, 149]. Кроме того флуоресцентные параметры используются для оценки фотосинтетической активности и продукции фитопланктона в природных условиях и культурах водорослей [71, 92, 127, 219]. Описываемый метод обладает высокой чувствительностью и позволяет быстро оценить ряд биофизических характеристик фитопланктона в режиме реального времени. Оперативность измерений показателей флуоресценции на экспедиционных судах имеет особое значение при изучении мезо-масштабных процессов в морских экосистемах, которые отличаются большой временной и пространственной изменчивостью [37, 168]. Применение этого метода позволяет

получить ценную информацию о неоднородности фотосинтетических процессов, протекающих в отдельных клетках также об изменении этого показателя в процессе роста культуры и при неблагоприятных воздействиях на них.

Согласно литературным данным [104], принято следующее ранжирование фотосинтетической активности (ФА) по величинам Fv/Fm : менее 0,1 – фотосинтетически неактивные (нежизнеспособные) клетки; 0,1-0,29 – низкая ФА; 0,30-0,49 – средняя ФА; 0,50-0,59 – высокая ФА; более 0,60 – максимальная ФА.

1.3.1 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a* водорослей в условиях культур

В литературе накоплен обширный материал о применимости относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* для оценки функционального состояния водорослей и физиологических изменений, происходящих в культурах в процессе их роста и при воздействии различного рода факторов. Особое внимание исследователи уделяли вопросу влияния уровня обеспеченности биогенными веществами на величину относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и эффективность работы ФС 2 [4, 20, 23, 37, 99, 140]. Авторами отмечалось падение данного показателя при недостатке минерального азота в среде [4, 10, 20, 37, 97, 111], и железа – [141, 148] для культур водорослей, что позволило использовать коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* как индикатор биогенного стресса. Вместе с тем, в работе [172] установлено, что в условиях непрерывной культуры и при достаточно длительной акклимации водорослей и стабилизации скорости роста, связь между показателем квантовой эффективности фотосинтеза и степенью лимитации азотом может отсутствовать. При этом авторы отмечают, что в природных условиях такая стабилизация недостижима в силу непрерывной изменчивости внешних факторов и указывают на возможную роль методических аспектов в этом вопросе.

В рамках биотестирования и токсикологических исследований показано применение относительной флуоресценции хлорофилла *a* в качестве маркера для контроля функционального состояния микроводорослей при воздействии на них различных токсических веществ [52, 70, 72, 91, 152].

Однако, несмотря на значимость таких физических факторов среды, как интенсивность света и температура в формировании продуктивности альгоценозов, их влияние на величину относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* изучено слабо. В литературе недостаточно работ, в которых подробно была исследована динамика изменения фотосинтетической активности водорослей в широком световом и температурном диапазоне для разных видов водорослей. При этом незначительное количество информации по этому вопросу не дает возможности систематизировать полученные результаты и связать их с видовыми особенностями или внутренними и внешними факторами. Из литературных данных известно, что при фотоингибировании происходит снижение значений относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Это снижение зависит от времени и интенсивности облучения [23, 130]. Необратимое фотоингибирование наступает в случае продолжающегося действия света на уже поврежденные реакционные центры. В этом случае не происходит ресинтеза белка D1 и реакционный центр становится необратимо поврежденным [203]. В работе [11] показано, что на начальных стадиях роста популяции клетки водорослей, адаптированных к высоким и к низким уровням освещения, имеют высокие средние значения Fv/Fm , падение данного параметра наблюдали для водорослей, выращенных на сильном свете в условиях стационарного роста на 50 день культивирования, тогда как водоросли, выращенные на слабом свете, не достигали стационарного уровня на 50 день культивирования и сохраняли высокие значения относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*.

Приводимые в литературе данные по влиянию температуры акклимации на величину Fv/Fm можно разделить условно на два типа: отсутствие влияния температуры акклимации на величину Fv/Fm в толерантной зоне [88, 145, 156, 188] и куполообразный вид зависимости с максимумом при оптимальных

температурах [218]. Есть данные, подтверждающие корреляцию снижения величины F_v/F_m и функциональной активности при температурах выше и ниже определенного уровня [134, 161].

1.3.2 Относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a* природных сообществ фитопланктона

Особенно актуальным остается вопрос оценки физиологического состояния природных сообществ микроводорослей. Многочисленные исследования показали ранее возможность оценки состояния альгоценозов с использованием относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* [30, 31, 45, 53, 108, 141, 154, 155, 198,]. Однако в ряде работ отмечено, что параметр F_v/F_m неэффективен в таких исследованиях в виду его видоспецифичности, коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла *a* зависит от таксономической принадлежности водорослей [93, 144, 198]. В литературе отмечалось, что параметр F_v/F_m не является надежным показателем функционального состояния водорослей рода *Synechococcus*, так как происходит искажение полученных данных из-за высокого содержания в их клетках фукоцианина [86, 93]. Авторами [68] исследованы температурные зависимости скорости роста, и величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* основных представителей планктонных водорослей Черного моря и показано, что значения F_v/F_m в толерантной зоне для диатомовых водорослей выше, чем для динофитовых и были равны соответственно 0,68 и 0,54.

При этом часто максимальная эффективность фотосинтетического аппарата коррелирует с обеспеченностью минеральным питанием фитопланктона [30, 149, 217]. В олиготрофных районах Средиземного моря и озера Байкал с низким содержанием биогенных элементов в фотическом слое значения F_v/F_m колебались от 0,3 до 0,55. В мезотрофных водах Черного моря активность F_v/F_m возрастала до 0,5—0,6. В сильно эвтрофированных водах северо-западной части

Черного моря активность фитопланктона достигала значений 0,7, что характерно для водорослей, выросших в оптимальных для роста условиях [30, 154, 155, 177].

Одновременное определение параметров флуоресценции и скорости ассимиляции углерода фитопланктоном в восточных и западных районах Южного океана [16] показало, что величина переменной флуоресценции хлорофилла *a* (потенциальная фотосинтетическая активность) в среднем варьировала в 1,38 раза, тогда как ассимиляционное число (реализованная фотосинтетическая активность) варьировало в более широких пределах (в среднем в 2,34 раза).

Таким образом, с учетом всего вышесказанного, проблема применимости коэффициента относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* в качестве маркера функционального состояния микроводорослей, несмотря на многолетние исследования, продолжает оставаться спорной и в настоящее время.

1.4 Подход к оценке физиологического состояния микроводорослей по размерному составу клеток

Клетки в популяции различаются по возрасту, размеру, скорости роста и, что особенно важно, по реакции на изменение условий обитания [13]. Характеристика состояния популяции водорослей, помимо включения интегральных показателей, должна содержать параметры, отвечающие за гетерогенность, увеличению степени которой, как правило, способствуют быстро меняющиеся условия среды [8]. Расширение спектра какого-либо из параметров клетки, различающихся по одному из признаков, может быть реакцией популяции на стрессовые условия, и как следствие отражать изменение её физиологического состояния.

Одним из распространенных подходов к объяснению наблюдаемой гетерогенности клеточных размеров водорослей является *возрастной подход*. Все различия между отдельными клетками могут быть объяснены с точки зрения нахождения их в разных фазах жизненного цикла, который способен значительно

трансформироваться под влиянием внешних условий [3, 157]. В исследованиях жизненного цикла диатомей отмечают три видоспецифичных размера клеток, известные как «кардинальные точки» [89, 117]. Максимальный размер клеток, получаемый из инициальных клеток, которые образуются внутри клеточной стенки ауксоспоры (специализированной клетки, образованной путем слияния гаплоидных гамет и способной к расширению в объеме); критический минимальный размер клетки – это наименьший размер клеток, при котором они могут существовать до того как либо увеличатся, либо погибнут; пороговый размер – это размер, при котором может быть индуцирован половой цикл [209].

Другая причина увеличения вариабельности размерного спектра клеток в пределах одной популяции или культуры может заключаться в неоднородности клеток по их физиологическому состоянию [60], т.к. мёртвые и неактивные клетки обладают отличными от живой клетки размерами из-за свойственного им набухания (увеличения) за счет вакуолизации [84]. Стрессовые условия окружающей среды приводят к деструктивным изменениям в мембранах хлоропласта – слипанию фотосинтетических мембран, увеличению интрамембранного пространства, а также разбуханию пластид, прогрессирующей вакуолизации, результатом чего является деплазмолиз и изменение формы клеток [40]. Особенно чётко разделение клеток водорослей на размерные группы проявляется в стационарной фазе роста [18, 41], где основной процент численности могут составлять малоактивные и мёртвые клетки, отличающиеся по своим размерным характеристикам [54], вследствие модификации размеров вакуолей и потери жизнеспособности [94]. В экспериментах с *Alexandrium ostenfeldii* в стационарной фазе роста присутствовали клетки в диапазоне от 10 до 23 мкм, вариабельность всего размерного спектра была порядка 44 % [158], тогда как [168] в экспоненциальной фазе роста того же вида наблюдали высокую изменчивость объёма клеток водорослей, что предположительно было связано с присутствием делящихся и уже поделившихся клеток, отличающихся по размерам. Переход клеток тетрахимены и дуналиеллы из состояния гомеостаза в

стресс, вызванного добавлением меди в культуральную среду, характеризовался увеличением размаха варьирования морфологических показателей клеток [7].

Увеличение вариабельности размеров клеток водорослей, как результат разобшающего действия факторов, различающихся границами допустимых температурных и световых условий, отражены в работах [75, 76, 90].

При адаптации водорослей к субоптимальным значениям интенсивности света происходят изменения их размеров, что приводит к увеличению дисперсии всего размерного спектра. У *Isochrysis galbana*, *Pleurochrysis carterae*, *Chaetoceros gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira weissflogii*, *Coscinodiscus sp.* отмечен рост средних размеров клеток с возрастанием интенсивности света и значительное изменение форм клеток [110]. Объём клеток *Phaeodactylum tricornutum* уменьшался почти в три раза в ответ на снижение уровня облученности от 400 до 30 $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, а вариабельность его увеличивалась в два раза [108]. В опытах с *Gonyaulaxta marensis* обнаружена вариабельность объёмов клеток водорослей, обусловленная температурным фактором; акклимация водорослей к низкой температуре вызывала задержку клеточного деления, что приводило к появлению в популяции гигантских клеток [212].

Увеличение вариабельности клеточного объёма водорослей обнаружено при исследовании влияния токсических веществ на клетки фитопланктона [60, 91, 195]. Укрупнение клеток *Dunaliella tertiolecta* и *Phaeodactylum tricornutum*, по мнению авторов [170], вызвано изменением в проницаемости клеточных мембран под воздействием тяжелых металлов.

Размеры клеток водорослей также могут изменяться в зависимости от длительности фотопериода [197], спектрального состава света и его интенсивности [12].

В работах [67, 204] отмечено увеличение вариабельности размерного спектра клеток водорослей в ответ на увеличение солёности. Аномальные клетки или створки были обнаружены в некоторых культурах пресноводной *Cyclotella meneghiniana* при наибольшей исследуемой солёности – 16 ‰ [126]. Влияние солёности на размер клеток диатомеи *Corethron hystrix*, которая может нормально

расти в пределах довольно узкого диапазона солености от 28 до 32 ‰, было изучено Н.А. Айздайчер и Ж.В. Маркиной [67]. Жизнеспособные клетки этой водоросли меняли свои морфологические признаки при солености 24 ‰. Этот уровень солености, вероятно, свидетельствует о начале ограничения клеточного деления, поскольку общее количество клеток к концу эксперимента было ниже, чем в контроле. Снижение солености до 16 ‰ вызывало выраженные необратимые морфологические изменения, в том числе увеличение высоты клеток. Отмирающие клетки расширялись, вероятно, из-за нарушения целостности мембран, вследствие чего становится невозможной контролируемая экскреция из клетки метаболитов для снижения внутриклеточного осмотического давления [42].

Таким образом, для получения сравнимых данных требуется единый протокол окрашивания диацетатом флуоресцеина, всесторонний анализ основных физиологических и биохимических параметров клеток водорослей современными приборными возможностями, такими как, проточная цитометрия и относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a*. Это позволит максимально упростить систему контроля за состоянием культивируемого вида, выявить более чувствительные индикаторы летальных воздействий факторов среды на клетки водорослей, использование которых позволит быстро и эффективно охарактеризовать физиологическое состояние водорослей в различных условиях роста и спрогнозировать изменения, происходящие в экосистеме Черного моря.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили культуры морских водорослей разных таксономических групп: Bacillariophyceae *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897), *Nitzschia* sp. №3 (Pr.-Lavr., 1955), *Chaetoceros affinis* (Lauder, 1864), *Skeletonema costatum* (Cleve, 1878), Prymnesiophyceae *Isochrysis galbana* (Parke, 1949), Dynophyceae *Heterocapsa triquetrum* (Stein, 1883), *Prorocentrum pusillum* (Dodge, Bibby, 1973), Trebouxiophyceae – *Chlorella vulgaris suboblonga* (Andreeva, 1975) и Cyanophyceae – *Synechococcus* sp. штамм BS 9001. Водоросли хранятся в коллекции отдела экологической физиологии водорослей ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН».

2.2 Методы проведения экспериментов

2.2.1 Метод проточной цитометрии

Регулярные измерения исследуемого материала были проведены на базе лаборатории микропланктона ИнБЮМ с использованием проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, что показано на рисунке 2.1.

Принцип метода проточной цитометрии заключается в оптическом анализе клеток или их частей в гидродинамически узконаправленном потоке, который пересекает сфокусированный лазерный пучок. Поскольку частицы (чаще всего клетки) анализируются по одной, в результате измерения имеется не только среднее значение параметра, но и его распределение в популяции. Высокая

скорость измерения (до 10^3 частиц в секунду) обеспечивает получение статистически достоверных результатов за короткое время. Современная оптика цитометра позволяет регистрировать сигнал в 2 каналах рассеяния (малоугловое и боковое) и до 5 каналов флуоресценции одновременно.



Рисунок 2.1 – Проточный цитометр Cytomics™ FC 500

Рассеяние света частицей под углом от $0,5^\circ$ до 19° к оси возбуждающего луча называется малоугловым (*forward scatter, FS*). Интенсивность малоуглового рассеяния зависит от размеров (площади сечения) и коэффициента преломления частицы. При одинаковом коэффициенте преломления крупные частицы рассеивают больше света под малыми углами, чем мелкие. Боковым (*side scatter, SS*) называют рассеяние (фактически отражение) света под углом 90° к оси возбуждающего луча. Отражение происходит от границ сред с различными коэффициентами преломления, поэтому интенсивность бокового рассеивания отражает гранулярность клетки. Интенсивность SS достаточно велика и заметно превышает интенсивность FS.

После отсечения рассеянного света, оставшийся свет распределяется по 5 каналам флуоресценции (FL от 1 до 5), которые центрированы примерно на 525 нм, 575 нм, 610 нм, 675 нм и 755 нм. Оптический путь света флуоресценции построен так, что сигнал, попадающий на каждый из детекторов, проходит

наименьшее число фильтров.

FL1 – FL5 - каналы детекции специфического флуоресцентного сигнала красителя на разной длине волны. Использование нескольких флюоресцентных меток позволяет проводить одновременный двух-, трехцветный и более анализ (Cytomics™ FC 500 позволяет работать одновременно с 5 метками), так как каждый флюорохром при прохождении через луч лазера испускает свет различной длины волны [39, 119, 167].

Метод определения численности и размеров клеток микроводорослей на проточном цитометре Cytomics™ FC 500

Общую численность микроводорослей в культурах и в природных пробах воды определяли в кластере на 2-х параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной (FL4, 675 нм) и оранжевой (FL2, 575 нм) спектральных областях на безразмерных логарифмических шкалах [33]. Оранжевая флуоресценция фикоэритрина (FL2, 575 нм) была использована для идентификации кластеров *Synechococcus* - пикоцианобактерий [33, 153]. Эти группы образуют кластеры на цитограммах, которые характеризуются высоким содержанием фикоэритрина, в то время как у пикоэукариотического фитопланктона он отсутствует. Концентрацию клеток рассчитывали по скорости протока пробы (60 мкл мин^{-1}), времени счёта (100-360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени. Контроль качества измерений численности производили с помощью калибровочных флуоросфер (Flow-Check™, Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Относительный размер клеток микроводорослей определяли в кластерах по прямому (FS) и боковому светорассеиванию (SS) на линейных шкалах [153].

Абсолютный средний размер рассчитывали с помощью калибровки, показанной на рисунке 2.2, для которой использовали водоросли различных размерных групп: *Prorocentrum pusillum* (средний диаметр $4,94 \pm 0,5 \text{ мкм}$),

Isochrysis galbana (средний диаметр $3,8 \pm 0,62$ мкм), *Synechococcus* sp. штамм BS 8902 (средний диаметр 1 мкм), *Synechococcus* sp. штамм BS 9003 (средний диаметр $1,3 \pm 0,7$ мкм), *Monochrysis lutheri* (средний диаметр $2,1 \pm 0,1$ мкм), размеры которых были измерены специально под световым микроскопом ZEISS Primo Star.

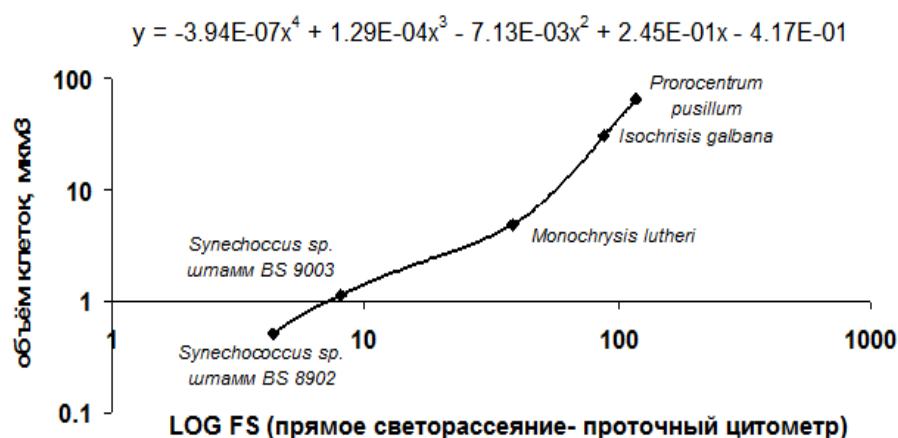


Рисунок 2.2 – Зависимость величины прямого рассеяния (FS) от объёма клеток различных видов микроводорослей

Биомассу исследуемых размерных групп пикофитопланктона и нанофитопланктона в единицах углерода рассчитывали с использованием коэффициентов, определенных в работах [128] для *Synechococcus*, для пикоэукариотов [213] и [207] для нанофитопланктона соответственно.

Метод определения численности метаболически активных и неактивных клеток микроводорослей на проточном цитометре Cytomics™ FC 500

Для оценки доли метаболически активных клеток в культурах микроводорослей и в природных сообществах использовали диацетат флуоресцеина (FDA), максимумы возбуждения и эмиссии 494 и 518 нм соответственно. Данный флуорохром пассивно проходит через цитоплазматическую мембрану клеток. Перевод красителя в светящуюся форму

осуществляется неспецифическими эстеразами [136]. FDA позволяет определять целостность мембран. Скорость выведения флуоресцирующего красителя из клеток ниже скорости его поступления, потому уменьшение свечения FDA свидетельствует о мембранных повреждениях [182]. Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с [96] – после оттаивания красителя при комнатной температуре его медленно добавляли в интенсивно перемешиваемую пробу в количестве 1 мкл мл⁻¹. Окраску производили в темноте в течение 20 мин (для выбора оптимального времени предварительно проводили тестовые окраски от 3 до 55 мин).

Ферментативную активность и содержание пигментов в клетках оценивали на 2-х параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (канал FL1 в зелёной области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции (FL4 в красной области спектра, 675 нм) на безразмерной логарифмической шкале. По положению кластера точек на цитограмме определили 4 сектора, соответствующие живым и физиологически активным клеткам (FL1⁺); малоактивным и мёртвым клеткам (FL1⁻); клеткам с высоким (FL4⁺) и низким (FL4⁻) содержанием пигментов, и исследовали их динамику в ходе экспериментов, что показано на рисунке 2.3.

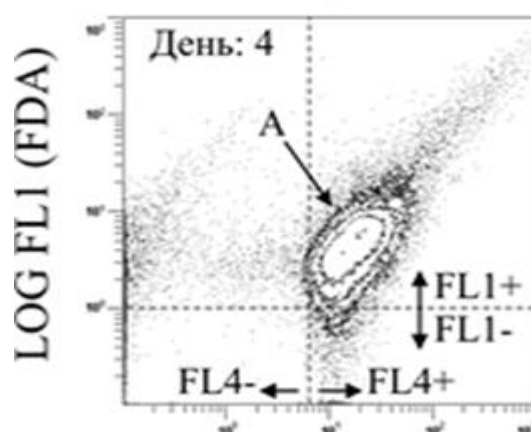


Рисунок 2.3 – Ферментативная активность (FL1 – флуоресценция FDA) и содержание пигментов (FL4 - автофлуоресценция) в клетках *Nitzschia* sp. №3 A – кластер, соответствующий культуре микроводорослей. Прерывистыми линиями обозначены границы четырёх субпопуляций клеток

Также рассчитывали среднее значения аккумулярованной флуоресценции FDA на клетку, обозначив её, как FDA_{fl} .

Цитометрические данные обрабатывали с использованием программы *flowingsoftware 2* (www.flowingsoftware.com).

2.2.2 Метод относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*

Величину относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, характеризующую максимальную квантовую эффективность фотосистемы 2 (ФС2) (в литературе встречаются определения, как эффективность первичного разделения зарядов, КПД использования световых квантов и др.) под которой далее по тексту будет пониматься коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* [100, 171, 177] определяли на флуориметре МЕГА 25 [23, 177], разработанном на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, по формуле (2.1):

$$F_v / F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (2.1)$$

где

F_m – максимальная флуоресценция после серии световых вспышек насыщающих реакционные центры фотосинтеза;

F_0 – величина флуоресценции при открытых реакционных центрах;

Перед измерением пробы выдерживали 15 минут в темноте при температуре акклимации.

Основным элементом работы прибора флуориметра МЕГА 25 является «одиночное измерение» (Single measurement) – однократная запись кривой индукции флуоресценции после завершения предварительных процедур (рисунок

2.4):

- Перемешивание (Stirring). Возбуждающий свет выключен. В начале процедуры происходит автоматическое включение привода магнитной мешалки, а в конце - его отключение.
- Пауза (простой, Idle). Необходима для остановки движения частиц в кювете после перемешивания. Ее минимальная продолжительность подбирается опытным путем в зависимости от объема жидкости в кювете и интенсивности перемешивания.
- Накопление сигнала F_o или адаптация образца к свету и накопление сигнала F_t в конце адаптации.

Индукция флуоресценции регистрируется при фиксированном значении интенсивности возбуждающего света около $5000 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-2}$.

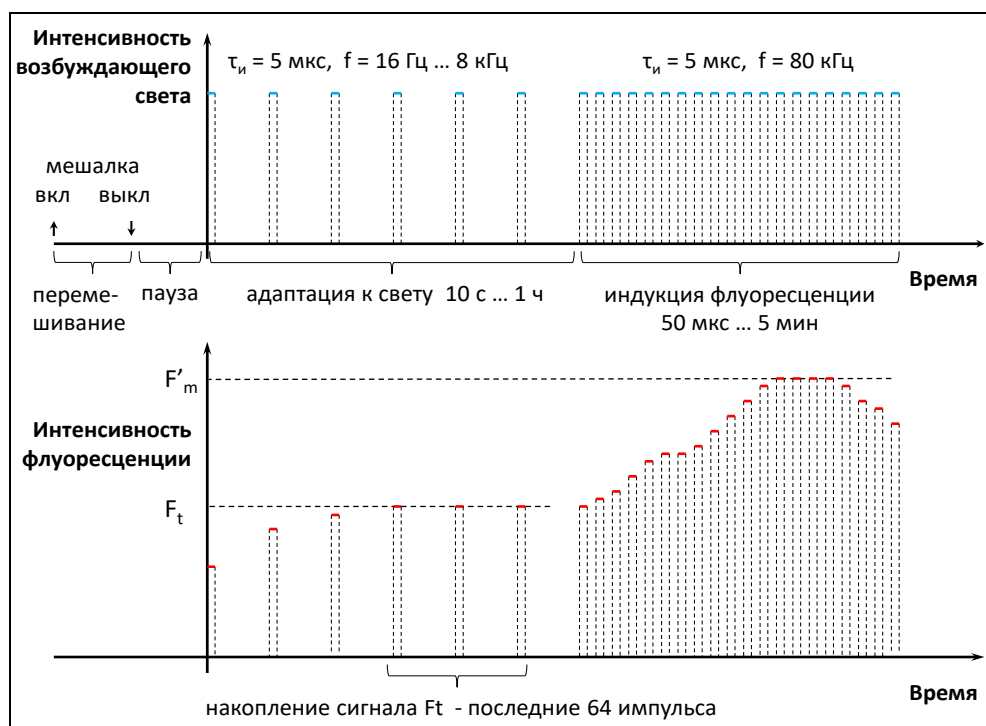


Рисунок 2.4 – Временная диаграмма одиночного измерения (Single measurement) с перемешиванием, паузой и предварительной адаптацией объекта к свету (рисунок И.В. Конюхов)

На основе элемента Single measurement построен более сложный тип измерений – Signal averaging, который представляет собой многократное повторение (1 и более раз) Single measurement с одними и теми же настройками (параметрами). Данный режим используется для увеличения отношения сигнал/шум на кривой индукции флуоресценции и увеличения точности определения F_v/F_m . Уменьшение высокочастотных шумов на индукционной кривой достигается за счет усреднения нескольких кривых индукции. В теории, амплитуда шумов при усреднении будет уменьшена в $\sqrt{n}$ раз, где n – количество повторов. Естественно, что повторное облучение клеток водорослей светом насыщающей интенсивности не проходит для них совершенно бесследно, даже при перемешивании и больших интервалах между измерениями. F_v/F_m в таком режиме систематически снижается. При использовании мешалки, усреднение дает репрезентативный сигнал по всему содержимому кюветы, а не только по ее облучаемой области. Это важно при малом числе клеток или колоний клеток, хаотичное перемещение которых по кювете дает заметную флуктуацию общей амплитуды сигналов флуоресценции (и F_o и F_m).

Также в работе использовали стандартные методы определения содержания углерода, азота и хлорофилла a в клетках водорослей, метод световой микроскопии.

Содержание органического углерода и азота в клетках водорослей определяли методом газо-адсорбционного хроматографического анализа на CHN-анализаторе в двух повторностях [122].

Концентрацию хлорофилла a в пробах определяли спектрофотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Karl Zeiss Jena). Расчет концентрации пигмента проводили по общепринятой формуле [135].

Удельную скорость роста водорослей в разных фазах накопительной культуры рассчитывали по приросту углерода или численности клеток в пробе по формулам (2.2, 2.3) [57].

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

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \quad (2.3)$$

где

μ - удельная скорость роста, сут.⁻¹;

C_0 и C_t —исходная концентрация углерода и его количество через время t , мг·л⁻¹;

N_0 и N_t – исходная численность клеток и ее количество через время t , кл·мл⁻¹;

t – время между измерениями в сутках.

Численность и линейные размеры клеток *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum* определяли методом прямого счета в капле объемом 0,01 мл под световым микроскопом ZEISS Primo Star [9]. Объем клеток вычисляли по методу геометрического подобия на основе измерений линейных размеров не менее 100-300 клеток [5, 199].

2.3 Условия проведения экспериментов

Эксперименты с культурами микроводорослей

Во всех экспериментах альгологически чистые культуры выращивали на среде f/2 [124] и освещали люминесцентными лампами (Philips TLRS 20W/54765) холодного свечения непрерывно в течение 3–30 сут. Освещённость измеряли люксметром Ю-116. Для перевода освещённости в энергетические единицы принимали, что 1клк = 17,2 мкЭ м⁻²·с⁻¹ [38]. Эксперименты проводили в двух повторностях. Было разработано 6 серий экспериментов. Общий объем проведенных экспериментов составил 42 опыта.

Первая серия экспериментов. Исследование динамики физиологически

активных и неактивных клеток микроводорослей.

Культуры *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia* sp. № 3 выращивали в колбах объёмом 500 мл в течение 21 суток, при температуре 20 °С и освещённости 103 мкЭ м⁻² с⁻¹.

Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали аликвоты объёмом 3 мл в 3-х повторностях. Динамику соотношения физиологически активных и неактивных клеток исследовали в период роста, в стационарной стадии и стадии отмирания клеток.

Вторая серия экспериментов. Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста и освещённости.

Эксперименты проводили с культурами: *Chlorella vulgaris suboblonga*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, черноморский вид цианобактерий-*Synechococcus* sp. штамм BS 9001.

Chlorella vulgaris suboblonga и *Phaeodactylum tricornutum* выращивали в накопительном, непрерывном режиме культивирования при двух интенсивностях света: 258 мкЭ м⁻² · с⁻¹ и 17 мкЭ м⁻² · с⁻¹. Температура поддерживалась в диапазоне 18-20 °С.

Проведено исследование действия интенсивности света 900 мкЭ м⁻² · с⁻¹ после адаптации *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Synechococcus* sp. штамм BS 900 к освещённости 20 мкЭ м⁻² · с⁻¹. Время экспозиции составило 24 часа. Температура поддерживалась в диапазоне 18-20 °С.

Третья серия экспериментов. Оценка функционального состояния микроводорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флюоресценции хлорофилла.

Накопительную культуру *Chlorella vulgaris suboblonga* выращивали в течение 22 суток при постоянном свете 43 мкЭ м⁻² с⁻¹, затем после разведения переставляли на три освещённости 250, 50 и 20 мкЭ м⁻² с⁻¹ и выращивали в течение 12 суток. Температура поддерживалась в диапазоне 18-20 °С.

Четвертая серия экспериментов. Исследовали адаптационные изменения

водоросли *Phaeodactylum tricornutum* и флуоресцентных показателей в различных условиях среды. Культуру выращивали в двух повторностях при температуре 20 °C и интенсивности света 34 мкЭ м⁻² с⁻¹ в течение 14 суток с двукратно уменьшенным содержанием азота относительно исходной среды. Интенсивность света определяли на уровне дна культивационным зондирующим 4П датчиком квантометра QSL 2101 (Biospherical Instruments Inc., США), диапазон, которого составляет 400-700 нм (ФАР).

Для исследования влияния светового фактора *Phaeodactylum tricornutum* адаптировали дискретно к освещенностям от 14 до 1720 мкЭ м⁻² с⁻¹ при температуре 20 °C в конических 250 мл колбах в течение периода времени, достаточного для соответствующей стабилизации роста при данной освещенности (3-7 суток). Облучение осуществлялось светодиодами белого света (4000 °K), различные уровни которого достигались изменением расстояния до источника света и применением затемняющих фильтров.

Температурную акклимацию проводили в диапазоне от 3 до 27 °C при постоянной освещенности 34 мкЭ м⁻² с⁻¹ в течение периода времени, достаточного для соответствующей стабилизации роста при данной температуре (3-6 суток). Для создания необходимых температурных условий использовали термостатированный бокс с регулируемой температурой. Практически достигнутая точность поддержания температуры была $\pm 0,1$ °C.

Концентрация клеток культуры поддерживалась примерно на одном уровне в экспоненциальной фазе роста путем периодического (1 раз в сутки) разбавления свежей питательной средой. Текущий контроль осуществлялся путем измерения оптической плотности суспензии. Оптическая плотность суспензии определялась на спектрофотометре СФ 26 ЛОМО на длине волны 750 нм в 10-ти сантиметровой цилиндрической кювете, закрепляемой внутри кюветного отделения в специально изготовленном держателе. Возможность использования оптической плотности, как показателя биомассы для разных видов, была исследована ранее, и получена линейная зависимость между этой величиной и концентрацией клеток [59]. Стандартное отклонение (S) измерения оптической плотности определялось

путем статистической обработки серии измерительных процедур ($n=12$) и составляла 0,047 опт.ед. При минимальных экспериментальных плотностях измеряемых суспензий равных 0,3 опт. ед. коэффициент вариации не превышал 16 %. Величина pH культуральной среды контролировалась и находилась в пределах 8,2 – 8,5.

Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали аликвоты объёмом 3 мл.

Пятая серия экспериментов. Исследование вариабельности размерного спектра клеток микроводорослей при разных световых и температурных условиях.

Объектом исследования служили диатомовые водоросли: *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*, динофитовые: *Heterocapsa triquetrum*, *Prorocentrum pusillum*, и зелёная *Chlorella vulgaris suboblonga*. *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum*, *Heterocapsa triquetrum*, *Prorocentrum pusillum*, которые выращивали в накопительном режиме при двух интенсивностях света: 43 и 206 мкЭ м⁻² с⁻¹, температуру поддерживали в диапазоне 19-20 °С. *Phaeodactylum tricornutum*, *Chlorella vulgaris suboblonga* адаптировали к температурам 10 °С и 20 °С при интенсивности света 34 мкЭ м⁻² с⁻¹. Продолжительность опытов составила от 5 до 25 суток, в зависимости от исследуемого вида.

Численность клеток *Chaetoceros affinis*, *Skeletonema costatum* измеряли методом прямого счета в капле 0,01 мл под световым микроскопом ZEISS PRIMO STAR. Расчет численности *Heterocapsa triquetrum*, *Prorocentrum pusillum*, *Phaeodactylum tricornutum* и *Chlorella vulgaris suboblonga* производили с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500. Цитометрические измерения проводили в 3-х повторностях в пробах объёмом 2 мл. Расчет объёмов клеток водорослей производили в соответствии с калибровкой (рисунок 2.2).

Для оценки уровня изменчивости клеточных размеров на основании коэффициента вариации использовали шкалу А. С. Мамаева [28]. Достоверность результатов исследований определяли с помощью критерия Стьюдента [26].

Эксперименты с пробами in situ

Полевую апробацию метода витальной окраски водорослей диацетатом флуоресцеина и исследование сезонной динамики биомассы, хлорофилла *a* и флуоресцентных показателей клеток пико и нанофитопланктона проводили на модельной станции глубиной 5 метров, расположенной в Севастопольской бухте с внутренней стороны южного заградительного мола (рисунок 2.5). Пробы отбирали в поверхностном слое (0,1 м) раз в неделю с января по декабрь 2014 г. Наличие мола обуславливает затрудненный водообмен и защиту от волнового воздействия Севастопольской бухты. Не менее чем в 60 м от станции ближе к входу в бухту находится мидийная плантация [58]. Всего собрано и обработано 150 проб. В работе также использованы данные по содержанию биогенных элементов в Черном море, полученные сотрудником отдела аквакультуры и морской фармакологии в указанный период. Гидрохимические параметры определяли согласно [35]: минеральный фосфор – по Морфи и Райли, аммоний – по Гроссгофу-Юхансену, нитраты – восстановлением до нитритов омедненным кадмием с последующим их определением единым «цветным» реактивом, кремнекислоту – по голубому кремнево-либденовому комплексу.

Температуру воды определяли непосредственно в момент отбора пробы. Освещенность измеряли в течение всего светового дня, каждый час с помощью люксметра Ю-116. Переходный коэффициент от освещенности в люксах к интенсивности солнечной радиации (ФАР) принимали равным $1000 \text{ лк} = 20 \text{ мкЭм}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [38]. Для цитометрического анализа отбирали аликвоты объемом 3 мл в 3 повторностях.

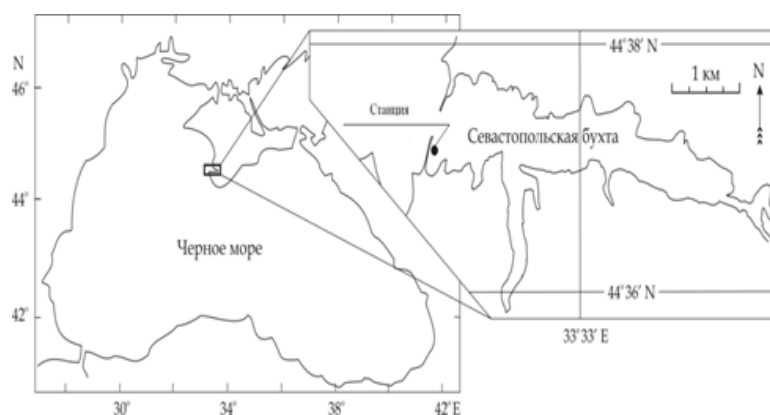


Рисунок 2.5 – Схема расположения станции отбора проб

2.4 Статистическая обработка данных

Рассчитывали средние арифметические (M), стандартные отклонения (SD), ошибки средней (m), достоверность различий выборочных средних с помощью парного t-критерия (α), коэффициенты корреляции (R). Для получения уравнений корреляции использовали линейный регрессионный анализ Р (99 % и 95 %). Статистическая обработка данных выполнялась по стандартным программным пакетам “Microsoft Excel 7.0”, “Statistica-5” и “Grapher-7” для персонального компьютера.

2.5 Объем проанализированного материала

Данные были получены в период работ 2008-2017 годов. Количество обработанных проб представлено в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Количество обработанных проб

	Общее количество проб	Из них микроскопия	Из них проточная цитометрия
Экспер. №1	280	-	280
Экспер. №2	470	25	445
Экспер. №3	580	30	550
Экспер. №4	370	130	240
Экспер. №5	490	200	290
Другие	150	-	150
Всего обработано проб		2340	

ГЛАВА 3 ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ЖИВЫХ, НЕАКТИВНЫХ И МЁРТВЫХ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

3.1 Оценка доли физиологически активных и неактивных клеток в культурах микроводорослей

Среди малоизученных вопросов — насколько отличаются оптимальные условия окраски разных видов микроводорослей витальным красителем FDA, и каким образом таксономический состав микроорганизмов в пробе может влиять на эффективность её окрашивания.

В связи с этим, были проведены следующие эксперименты (выбор оптимальных условий): а) окраска FDA двух видов микроводорослей, *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3. б) последующего определения доли физиологически активных клеток с помощью проточной цитометрии.

С увеличением продолжительности окрашивания проб FDA интенсивность флуоресценции клеток возрастала (смещение пика вдоль оси абсцисс на рисунке 3.1), а её вариабельность снижалась (более высокий и узкий пик). После 10 мин окрашивания характер флуоресценции водорослей менялся незначительно, за исключением небольшого роста пика у *P. tricornutum* (рисунок 3.1, А) и его смещения у *Nitzschia* sp. № 3. (рисунок 3.1, Б). При продолжительности окраски более 50 мин оценки численности FDA клеток оказывались завышенными, вероятно, за счёт неспецифической окраски мёртвых клеток. Таким образом, требовалась стандартизация процедуры окрашивания обеих культур для того, чтобы обеспечить корректное сопоставление результатов, полученных на разных этапах эксперимента.

В соответствии с результатами, представленными на рисунке 3.1 оптимальное время окрашивания обеих культур составляло около 20 мин, поскольку при этом достигалась максимальная интенсивность окраски клеток

(пик смещен вправо достаточно далеко, чтобы избежать недооценки окрашенных клеток) и её наименьшая вариабельность (узкий пик). Наши результаты хорошо согласуются с опубликованным протоколом 20-минутной окраски FDA разных видов микроводорослей для их исследования с помощью эпифлуоресцентной микроскопии [166]. Вместе с тем, нет полной уверенности, что методы окраски моновидовых культур окажутся столь же эффективными и в цитометрическом исследовании природного фитопланктона [63].

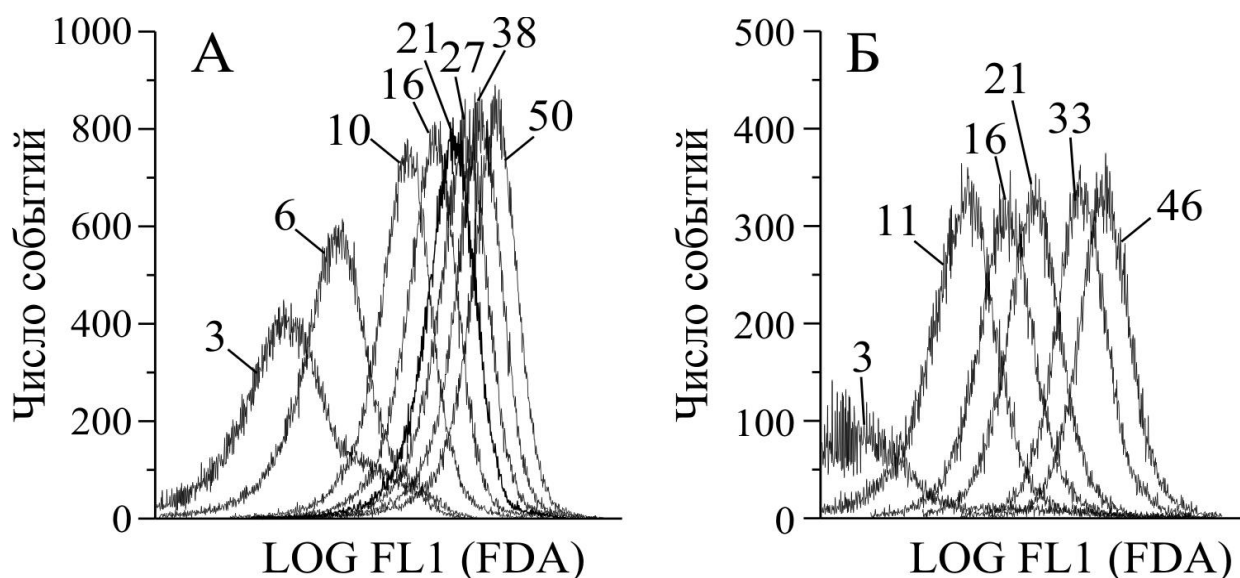


Рисунок 3.1 – Зависимость интенсивности и характера окраски микроводорослей от её продолжительности (время указано в минутах) в культурах *Phaeodactylum tricornutum* (А) и *Nitzschia* sp. № 3 (Б)

На рисунке 3.2 представлены некоторые из цитограмм, которые иллюстрируют конфигурацию кластера клеток, её изменение и смещение кластера в координатах FL4-FL1 на разных стадиях роста обеих культур. По мере старения культур снижалось внутриклеточное содержание пигментов (накопление FL4⁻) и ферментативная активность (FL1⁻), увеличивалось количество мёртвых клеток (смещение кластеров вниз и влево, рисунок 3.2).

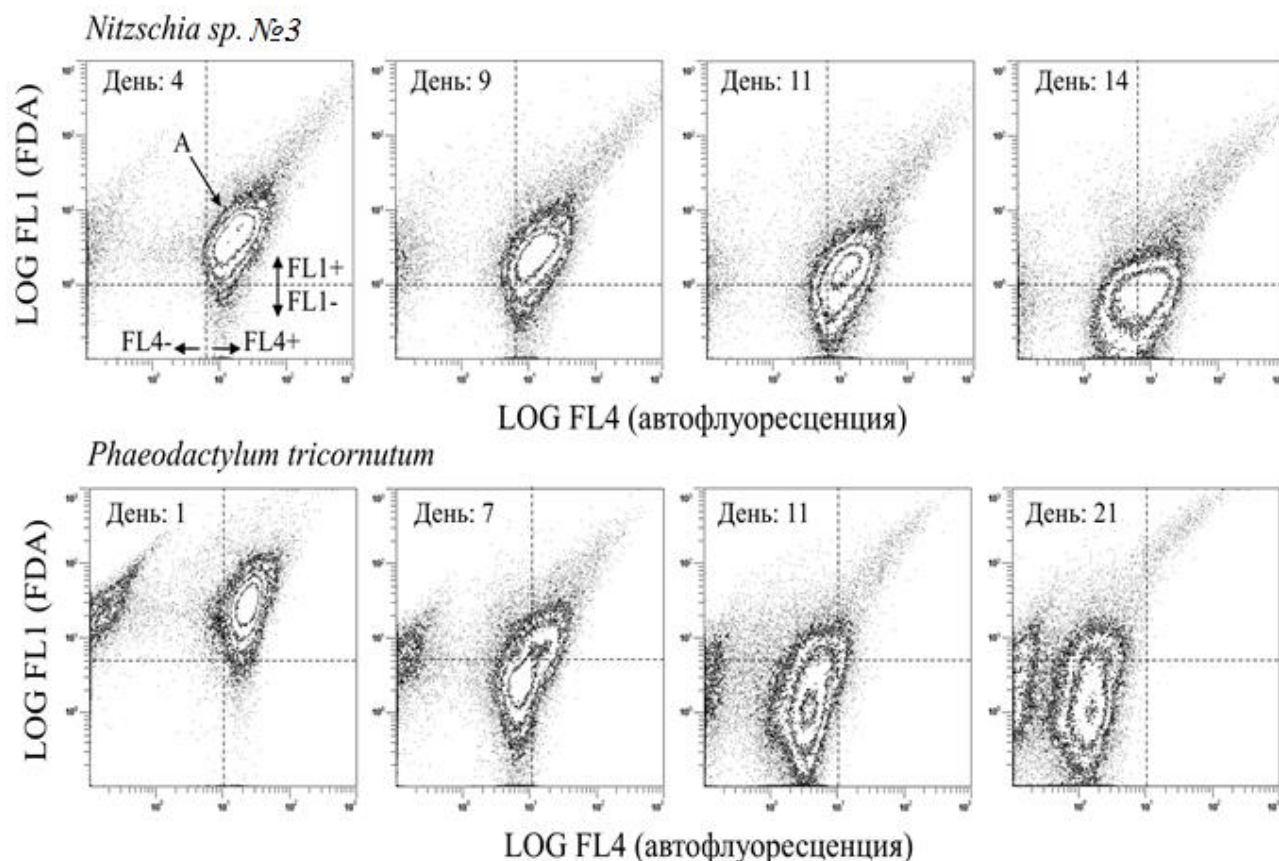


Рисунок 3.2 – Снижение ферментативной активности (FL1 – флуоресценция FDA) и содержания пигментов (FL4 - автофлуоресценция) в клетках культур микроводорослей. А – кластер, соответствующий клеткам культуры микроводорослей. Прерывистыми линиями обозначены границы четырёх субпопуляций клеток: живых и физиологически активных клеток (FL1+); малоактивных и мёртвых клеток (FL1-); клеток с высоким (FL4+) и низким (FL4-) содержанием пигментов

Динамика общей численности и доли малоактивных и мёртвых клеток (FL1⁻) в накопительных культурах представлена на рисунке 3.3. Выход культур в стационарную фазу наблюдали через 4 суток – у *Nitzschia* № 3 и 15 суток – у *P. tricornutum*. В экспоненциальной фазе роста доля мёртвых и малоактивных (FL1⁻) клеток не превышала 10 % в обеих культурах, тогда как в стационарной фазе она возрастала почти до 100 % у *Nitzschia* sp. № 3 и 70 % – у *P. tricornutum*, что показано на рисунке 3.4. На 15-е сутки культура *Nitzschia* sp. № 3 переходила в

стадию отмирания, и доля FL1[−] в общей численности микроводорослей снижалась в результате лизиса мёртвых клеток.

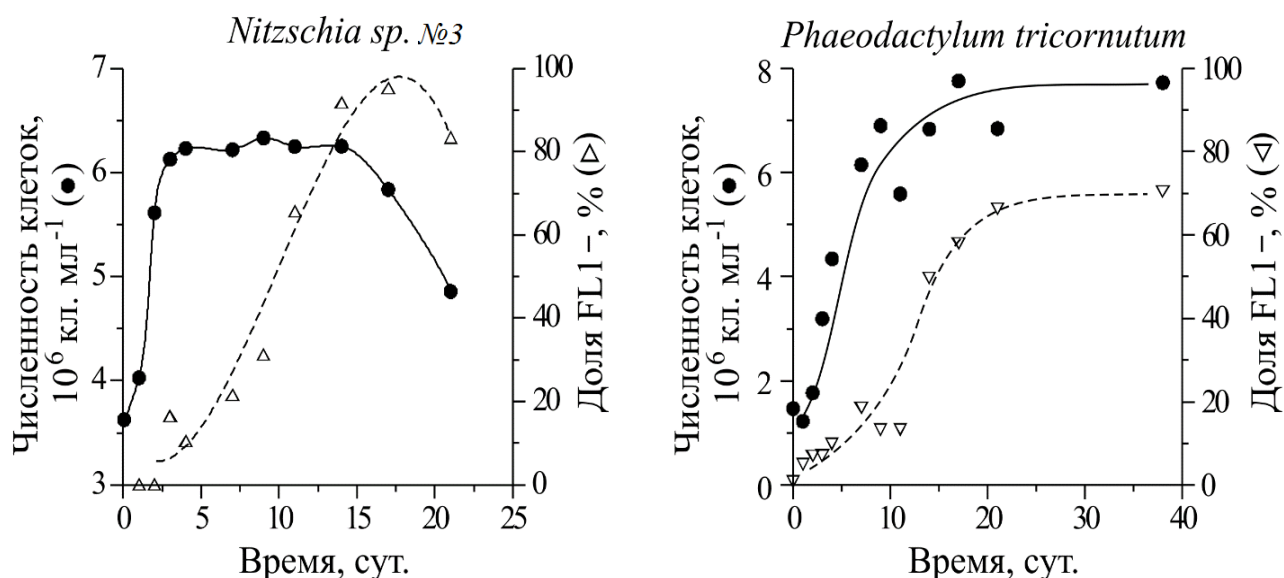


Рисунок 3.3 – Динамика общей численности и доли малоактивных и мёртвых клеток (FL1[−]) в накопительных культурах микроводорослей

Однако, растянутость кластеров клеток на рисунке 3.2 вдоль оси FL1, когда культуры находились в стационарной фазе роста, к сожалению, не даёт четкого представления о количестве мёртвых клеток, так как в большей степени данная культура представляет «субпопуляцию» из мертвых и малоактивных клеток. Расчёт непосредственно мёртвых клеток может быть затруднён и вследствие лизиса самих клеток, который по данным [29] при благоприятных условиях может составлять 2-3 часа. Решить эту задачу позволяет метод оценки доли живых и мертвых клеток по интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* клеток в красной (FL4, 675 нм) области спектра.

3.2 Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста в разных условиях освещённости

В живых активных клетках микроводорослей молекула хлорофилла *a* показывает красную флуоресценцию, в то время как мёртвые и разрушенные клетки характеризуются отсутствием автофлуоресценции. Накапливаемое в результате разрушения живых клеток органическое вещество в виде частиц взвеси, с малым содержанием хлорофилла, в литературе было определено, как «debris» (обломки, мусор) – частицы с размерами меньше размеров живых клеток водорослей, с низкой или отсутствующей автофлуоресценцией [87]. При этом количество, скорость образования и динамика содержания этих частиц могут быть способом исследования функционального состояния популяции микроводорослей в тех или иных условиях, т.к. характеризуют количество мёртвых клеток и позволяют оценить вклад детритной компоненты, связанной с разрушением клеток.

Для более точного выяснения количества и динамики мёртвых (фотосинтетически неактивных) клеток проведены эксперименты, в которых оценивали связь ФНВ (фотосинтетически неактивная взвесь) с плотностью культуры и световыми условиями.

На рисунке 3.4А представлена цитограмма, показывающая распределение частиц в культуре *Phaeodactylum tricornutum*, где каждая точка соответствует регистрируемому событию в координатах рассеяния и красной автофлуоресценции. На рисунке 3.4Б и 3.4В представлены распределения частот событий отдельно по величине рассеяния и автофлуоресценции. Как видно из этих рисунков, исследуемая культура может быть разделена на две группы частиц: частицы с высоким (область А) и низким (область Б) содержанием пигментов, различающаяся по размерной структуре. Область А в данном случае соответствует клеткам водорослей, а также, возможно, крупным фрагментам

клеток, содержащих неразрушенные пигменты. В области Б регистрируются бесхлорофилльные остатки или же фрагменты клеток водорослей.

Для более точного определения суммарного объема весь размерный диапазон, в котором наблюдались частицы, был разбит на 6 участков АА, Z, Y, X, T, M, что показано на рисунке 3.4А, в каждом из которых измерялся средний размер частиц и их количество. Объем рассчитывался по формуле сферы, где размер частиц рассматривался как её диаметр. Сумма этих величин представляла общий объем взвеси частиц в 1 мл исследуемой суспензии. Таким же образом определяли объем (в $\text{мкм}^3 \cdot \text{мл}^{-1}$) взвеси, содержащейся в используемой культуральной среде (профильтрованная и стерилизованная морская вода), который учитывали как фон.

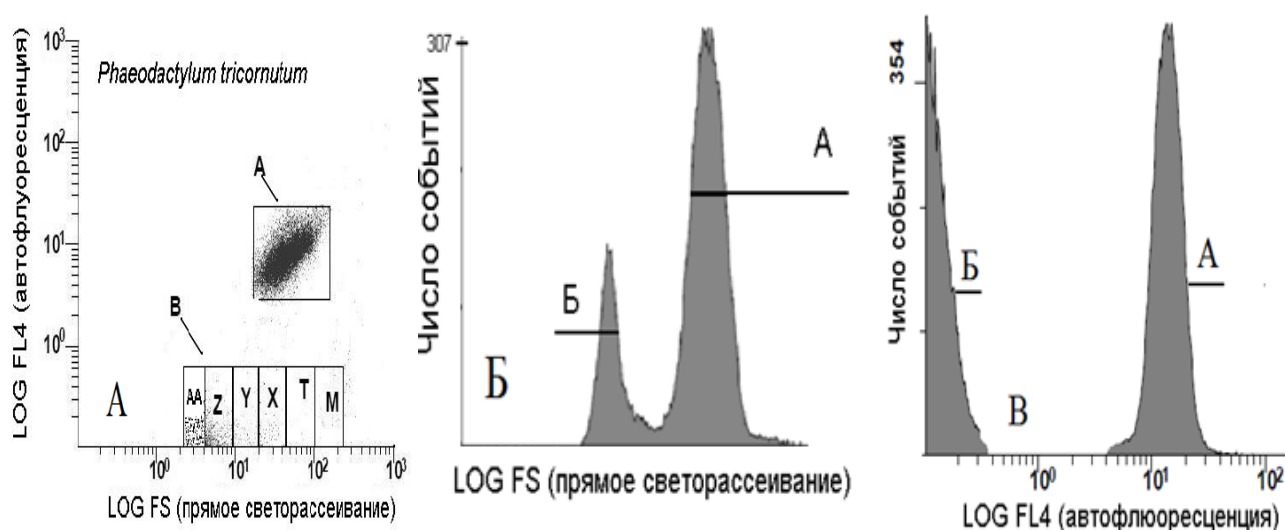


Рисунок 3.4 – Распределение частиц взвеси *Phaeodactylum tricornutum* в координатах: прямое светорассеивание (FS) и автофлуоресценция (FL4) (А). А – кластер, соответствующий клеткам исследуемой культуры, Б – частицы с низким содержанием пигментов (ФНВ). Размерный спектр культуры (Б). Частотный спектр культуры по автофлуоресценции (В)

При выращивании водорослей на низкой интенсивности света, относительная доля ФНВ составляла 1-2 % в начальной и экспоненциальной фазах роста. Для обеих культур наблюдалась тенденция к повышению ФНВ по

мере увеличения плотности культуры. В стационарной фазе отмечается увеличение доли ФНВ на фоне некоторого снижения численности клеток как для *P. tricornutum*, так и для *C. vulgaris suboblonga*, что показано на рисунке 3.5.

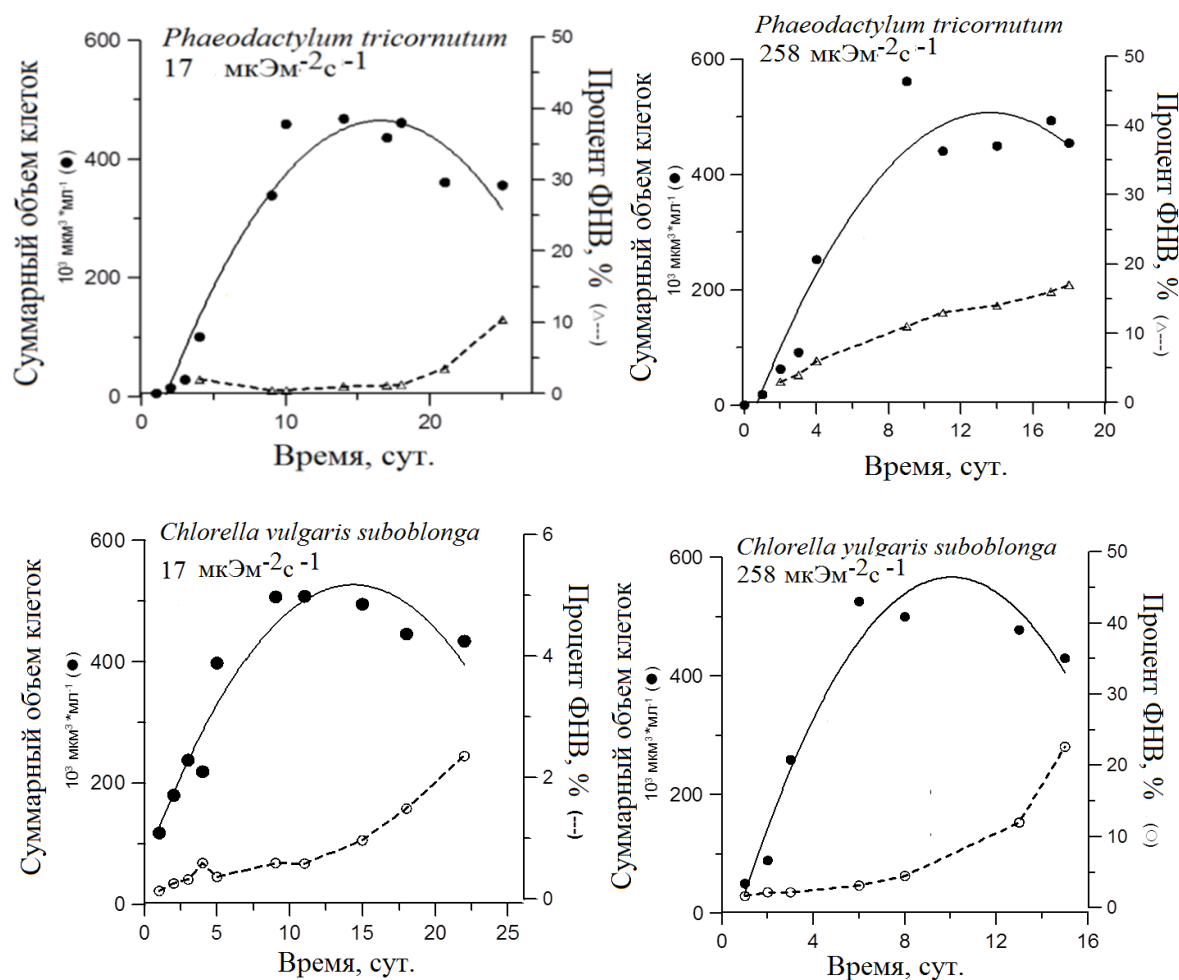


Рисунок 3.5 – Динамика изменения суммарного объёма клеток и фотосинтетической неактивной взвеси (ФНВ, %) в процессе роста накопительных культур *Phaeodactylum tricornutum* и *Chlorella vulgaris suboblonga* при двух освещённостях

В условиях роста культур, при освещённости 258 $\mu\text{Эм}^{-2}\text{с}^{-1}$ наблюдается более высокое процентное содержание ФНВ на всех стадиях роста и существенное накопление частиц в поздних стадиях роста. Интенсивное освещение приводит к повышению метаболической активности клеток (высокая скорость роста) и одновременно вызывает возрастание относительной доли

разрушенных фрагментов клеток.

Возможно, используемый уровень освещённости ($258 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) являлся избыточным для этих видов, в 3-5 раз превышая I_k (насыщающая рост клеток интенсивность света), что и является возможной причиной увеличения смертности водорослей, приводящей к повышению концентрации ФНВ. Показано, что высокий уровень освещённости может ингибировать рост и вызывать гибель клеток, однако такие эффекты наблюдаются при существенно более высоких значениях интенсивности света [14].

В стационарной фазе происходит снижение обеспеченности водорослей элементами минерального питания до уровня, при котором рост клеток останавливается [100]. Другим фактором, влияющим на состояние клеток в стационарной фазе, может являться их чрезмерная плотность, при которой возможны эффекты самоинтоксикации.

Известно, что отрицательное влияние на жизнеспособность *P. tricornutum* оказывают метаболиты, выделяемые культурой в стационарной фазе роста. Ингибирование роста обнаружено и для других диатомовых водорослей, а также для культур рода *Chlorella* [1, 2].

Проведен эксперимент с целью оценки влияния этих факторов на величину относительного содержания ФНВ взвеси в культуре *P. tricornutum*. Для этой цели была прослежена динамика изменения численности клеток и доли ФНВ в культурах водорослей, находящихся в стационарной фазе при высокой концентрации клеток ($13 \cdot 10^6 \text{ кл. мл}^{-1}$), и тех же водорослей, после десятикратного разведения стерильной профильтрованной водой ($1,3 \cdot 10^6 \text{ кл. мл}^{-1}$), что показано на рисунке 3.6.

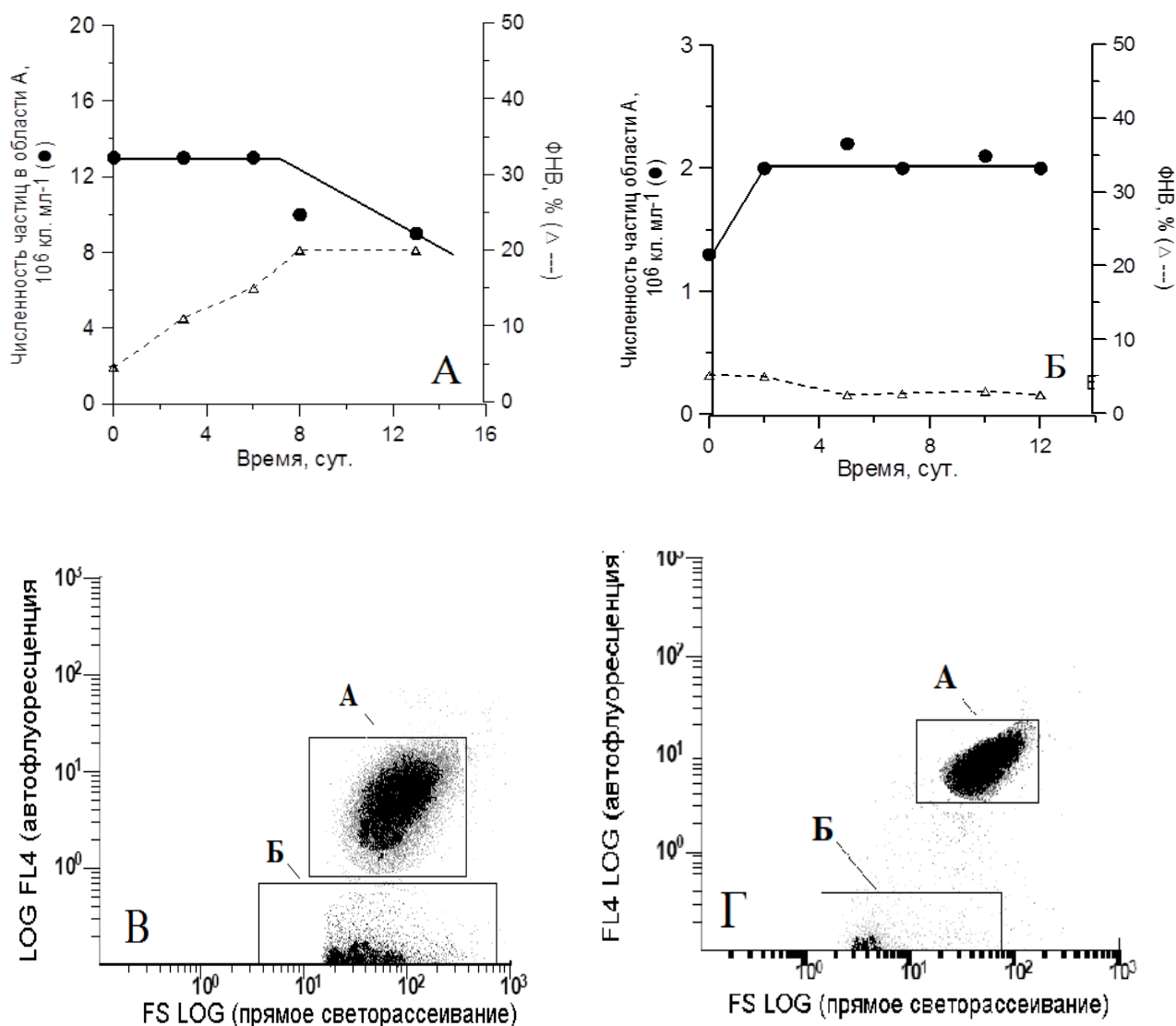


Рисунок 3.6 – Динамика численности клеток водорослей и относительного содержания объёма ФНВ для стационарного состояния в плотной (А) и разведённой (Б) культурах *Phaeodactylum tricornutum*, рисунки В, Г – цитограммы распределения частиц для этих культур на 8 сутки

В плотной культуре наблюдалась тенденция к снижению концентрации клеток, при этом доля ФНВ возрастала. В разведённой культуре отмечалось повышение концентрации клеток сразу после разведения и с последующей остановкой скорости роста. В этом случае доля ФНВ оставалась на низком уровне в течение всего эксперимента. На рисунках 3.6В и 3.6Г представлены цитограммы распределения частиц исследуемых суспензий для этих двух случаев. Обращает на себя внимание больший диапазон распределения событий, как по размерам, так

и по флуоресценции для густой культуры *P. tricornutum*, по сравнению с разведённой.

Высокая вариабельность этих величин в зоне А, которая соответствует непосредственно активным клеткам и, возможно, их крупным обломкам, сохранившим фотосинтетические пигменты, указывает на большую физиологическую неоднородность популяции и косвенным образом свидетельствует об ухудшении состояния водорослей. Так, в литературе подобное расширение области распределения частиц сопутствовало возрастанию количества мёртвых и малоактивных клеток в популяции [49]. Полученные нами данные в определенной степени подтверждают тот тезис, что плотностной фактор имеет негативное значение для водорослей, безотносительно к дефициту минерального питания.

В природных условиях водоросли зачастую подвергаются действию высокой освещенности ($800 - 1000 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Это может происходить на мелководье или когда они обитают в поверхностной плёнке.

Проведено исследования действия высокой освещенности ($900 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) при 24 часовой экспозиции после адаптации водорослей к $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Исследования проводили на следующих видах водорослей: диатомовой – *P. tricornutum*, примнезиофитовой – *I. galbana* и, одном виде сине-зеленных (черноморский вид цианобактерий - *Synechococcus* sp. штамм BS 9001). Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.7.

Действие света $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ во всех случаях приводило к ингибированию роста клеток и возрастанию доли ФНВ, однако степень воздействия различается для отдельных видов (рисунок 3.7). У *P. tricornutum* наблюдалось увеличение прироста биомассы клеток при экспозиции на высоком свете, а доля ФНВ возрастала до 25 % относительно общей биомассы клеток в течение суток. У *I. galbana* и *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 отмечалась убыль суммарного объёма клеток водорослей (биомасса водорослей) при увеличении доли ФНВ. Важно отметить, что уровни уменьшения клеточного объёма и прироста объёма ФНВ частиц несоизмеримы по величине.

Так при практически полном лизисе клеток *I. galbana* и уменьшении плотности биомассы на $20 \text{ мкм}^3 \text{ мл}^{-1}$ суммарный объём ФНВ увеличился почти в два раза (от $0,1 \cdot 10^6 \text{ мкм}^3$ до $0,22 \cdot 10^6 \text{ мкм}^3$), однако это изменение составило 1 % от изменения плотности водорослей. *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 в этом отношении занимает промежуточное положение: убыль клеточной компоненты была равна 6 мкм^3 , а прирост суммарного объёма ФНВ за сутки составлял порядка 15 % от этой величины.

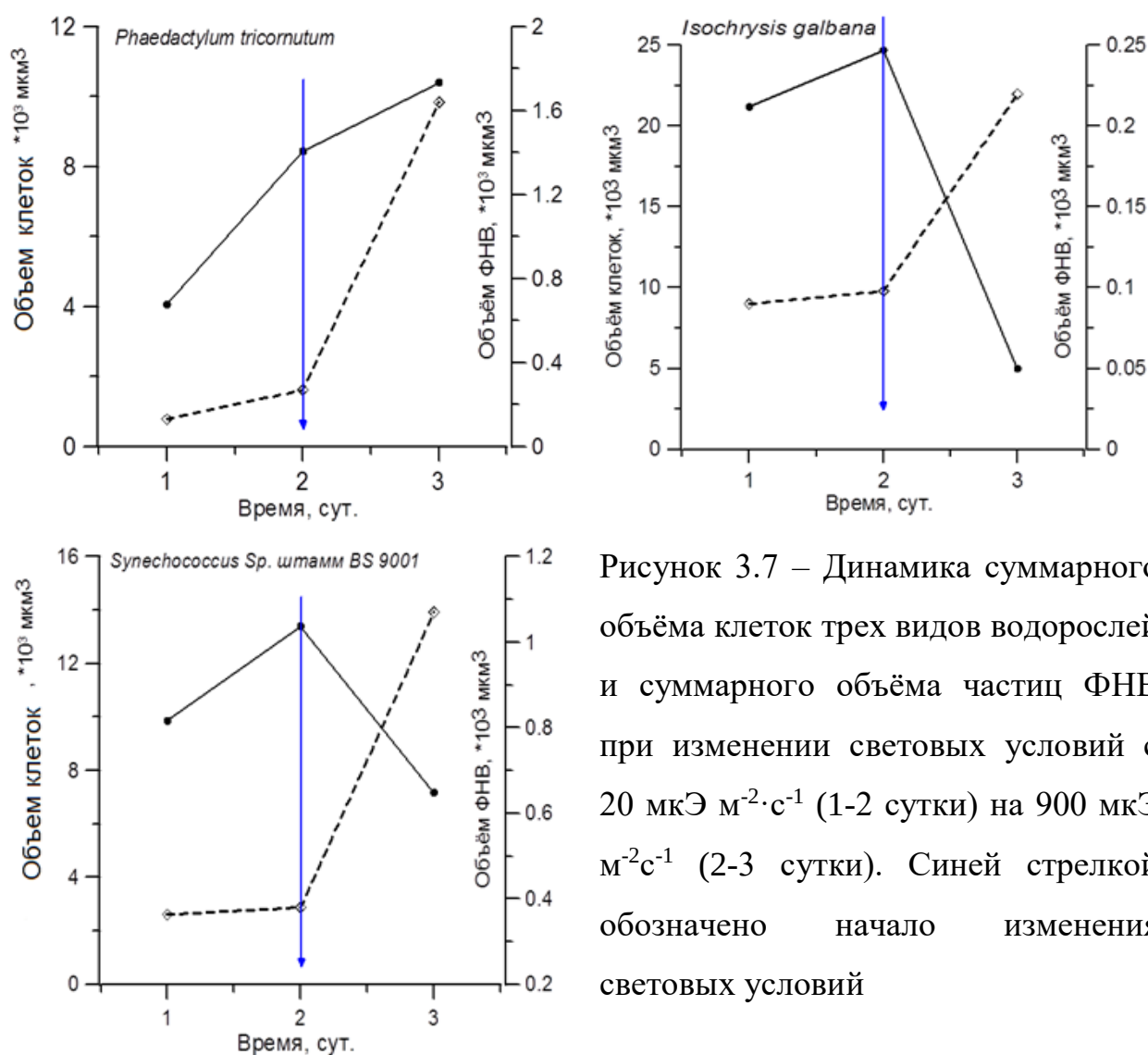


Рисунок 3.7 – Динамика суммарного объёма клеток трех видов водорослей и суммарного объёма частиц ФНВ при изменении световых условий с $20 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (1-2 сутки) на $900 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (2-3 сутки). Синей стрелкой обозначено начало изменения световых условий

Индуктируемое светом ингибирование роста водорослей и лизис клеток показывает различную устойчивость исследованных видов к экстремальной освещённости. В то же время, для них характерна различная степень накопления

разрушенных компонент клеток и мёртвых клеток. Накопление ФНВ является следствием лизиса и отмирания клеток с одной стороны, и последующей дезинтеграции и растворения – с другой. Оба эти процесса в значительной степени связаны с морфологическими особенностями клеток исследуемых видов микроводорослей, и особенностями строения их внешних оболочек. Так *P. tricornutum* и *C. vulgaris suboblonga* характеризуются наличием жестких структур в составе клеточных оболочек: кремнеземная оболочка, называемая «панцирем» характерна для *P. tricornutum* [6] и целлюлозоподобная структура, входящая в состав клеточной оболочки – для *C. vulgaris suboblonga* [165]. Лизис клеток этих видов приводит к образованию и накоплению клеточных фрагментов устойчивых к разложению и дезинтеграции. У клеток водорослей *I. galbana* отсутствует клеточная оболочка, окружающая цитоплазматическую мембрану, поэтому в условиях лизиса плазмалемма составляет незначительную часть общего вещества в клетке [150]. Суммарное содержание бесхлорофилльных клеток для этого вида не превышало 0,5 %. Лизис в результате действия светового фактора приводил к возрастанию этой величины до 2 % от исходной концентрации клеток. Можно предположить, что лизис клеток сопровождался растворением и быстрой дезинтеграцией плазмалеммы и других мембранных структур клетки до фрагментов, нерегистрируемых цитофлуориметром. Наблюдалось также быстрое обесцвечивание фотосинтетических пигментов, которое связано, с разрушением хлоропластов, как целостных структур.

Скорость перехода взвешенного органического вещества в растворенное и бактериальная минерализация являются важными процессами трансформации вещества в морских экосистемах. Показано, что лизис клеток происходит в течение 2-3 ч [29], при этом пятидесяти процентная бактериальная минерализация растворенной органики имеет порядок десятка часов, а минерализация взвешенного вещества (50 %) - несколько суток для детрита из различных видов водорослей [164].

Рассчитано процентное соотношение вкладов частиц ФНВ различных размерных групп (АА, Z, X, Y, T, M) (см. рисунок 3.4) в общей биомассе взвеси

для культуры *P. tricornutum*, растущей на низком свете и после суточной экспозиции на интенсивности света $900 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, что показано на рисунке 3.8.

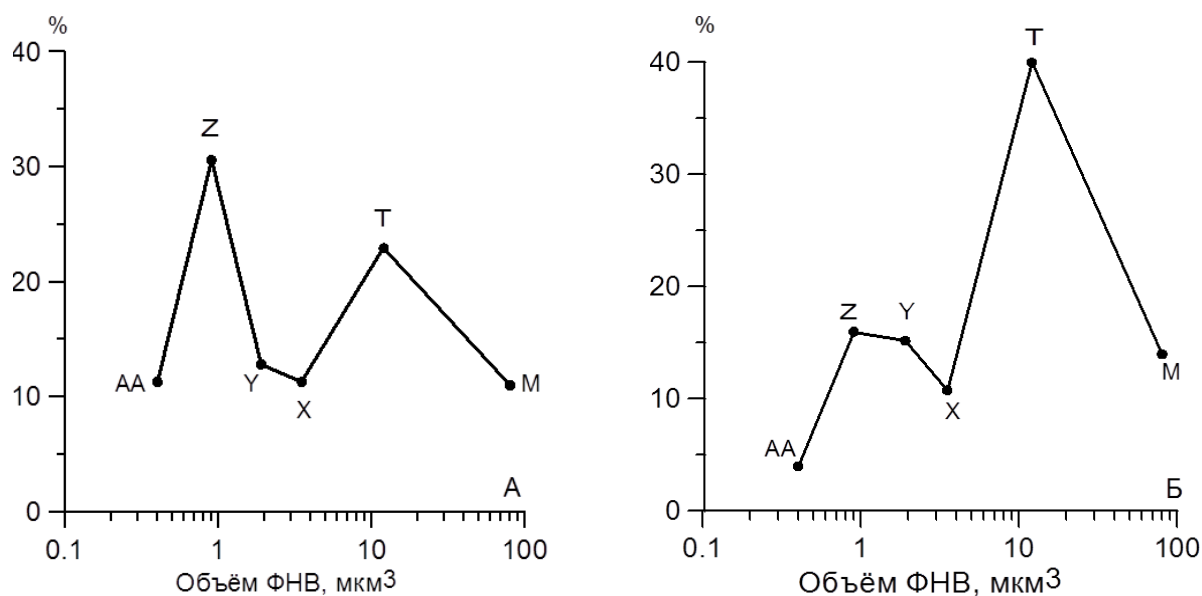


Рисунок 3.8 – Соотношение суммарных объёмов частиц ФНВ в различных размерных суммарных диапазонах (AA, Z, X, Y, T, M) (см. рисунок 3.4A) для культуры *P. tricornutum*, растущей на низком свете (А) и после суточной экспозиции на интенсивности света $900 \text{ мкЭ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Б)

Верхняя граница размеров ФНВ частиц соответствует среднему размеру клеток данной популяции. Присутствует также незначительное количество частиц большого размера, которые могут быть следствием агрегации более мелких единиц.

Максимальный объём взвеси культуры, растущей при умеренной освещенности, приходится на мелкие фракции клеток, объемом меньше 1 мкм^3 . Быстрое повышение общего содержания ФНВ у *P. tricornutum* в условиях экстремальных освещённостей приводит к изменению размерного состава этой взвеси. При сравнении рисунков 3.8А и 3.8Б можно отметить повышение доли крупных частиц после суточной экспозиции на высокой освещенности, что свидетельствует об определенной последовательности процесса разрушения

клеточного вещества.

В ряде работ также показано, что увеличение бесхлорофильных клеток водорослей при действии токсических веществ, свидетельствует об изменении функционального состояния исследуемых видов [104, 121, 131, 163, 180]. Воздействие на *Chlamydomonas moewusii* химических веществ (пестициды, лекарственные препараты) и тяжёлых металлов (медь) вызвало быстрое ингибирование природной флуоресценции клеток, с появлением бесхлорофильных клеток или «debris» (без эмиссии флуоресцентного хлорофилла) после трехчасовой выдержки в самых высоких концентрациях тестируемых веществ. Процент таких клеток резко увеличивался после 24 часовой экспозиции и достигал 90 % в случае воздействия меди и имазалила (действующее вещество пестицидов). Клетки с низкой или отсутствующей флуоресценцией у *Chlorella vulgaris* наблюдались только при воздействии высокой концентрации меди [181].

Таким образом, в культурах водорослей присутствуют мёртвые частицы, которые являются продуктом лизиса клеток и последующей дезинтеграции клеточных структур. Относительная доля этих мёртвых клеток для водорослей, растущих в благоприятных условиях, при невысокой освещённости, зависит от вида водорослей (структуры их клеточных оболочек) и физиологического состояния культуры. Для клеток с жесткими целлюлозоподобными (*C. vulgaris suboblonga*) и кремниевыми (*P. tricornutum*) оболочечными структурами эта величина составляет 1-2 % от объёма всей клеточной биомассы, для клеток, окруженных только цитоплазматической мембраной, не превышает 0,5 %.

Структура клеточных оболочек определяет и скорость последующего растворения и минерализации клеточных компонент. Для *I. galbana* и *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 наблюдается быстрое растворение клеточных фрагментов после лизиса клеток в условиях стрессового светового воздействия, в то время как для *C. vulgaris suboblonga* и *P. tricornutum* отмечается существенное накопление органической взвеси при депрессии скорости роста. Доля частиц ФНВ увеличивается при переходе культуры в стационарную фазу роста и при

избыточной интенсивности света. При освещенности $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдается ингибирование роста *P. tricornutum* и интенсивный лизис клеток *I. galbana* и *Synechococcus* sp. штамм BS 9001, что сопровождается возрастанием количества ФНВ. В условиях стационарной фазы роста повышенная смертность водорослей *P. tricornutum* и увеличение доли ФНВ в большей степени вызывается факторами, связанными с чрезмерной плотностью культуры, чем дефицитом минерального питания.

Таким образом, результаты, представленные в этом разделе, позволяют сделать ряд обобщений.

Накопительные культуры *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3 хорошо окрашивались диацетатом флуоресцеина (FDA) на разных стадиях роста, что позволяло эффективно оценивать долю живых и физиологически активных клеток в них с помощью проточной цитометрии. Оба исследованных вида показали удовлетворительные результаты окраски FDA и, следовательно, такой подход возможен для определения доли живых клеток в природных популяциях.

Оптимальное время окраски составило 20 минут. В экспоненциальной фазе роста доля мёртвых и малоактивных клеток не превышала 10 % в обеих культурах, тогда как в глубокой стационарной фазе она возрастала почти до 100 % у *Nitzschia* sp. № 3 и 70 % – у *P. tricornutum*.

Исследована мёртвая взвесь в культурах планктонных водорослей, выращенных при различных освещённостях с разной плотностью. Наряду с живыми, активными клетками водорослей, в культурах присутствует также слабо флуоресцирующая составляющая, частицы которой представляют собой продукт отмирания и лизиса клеток водорослей (ФНВ – фотосинтетически неактивная взвесь). При благоприятных условиях роста объёмная доля этой взвеси составляет 1-2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных

цитоплазматической мембраной.

Установлено, что в стационарной фазе роста, а также при высоких интенсивностях света, доля мёртвых и разрушенных клеток возрастает до 10-20 % для *C. vulgaris suboblonga* и *P. tricornutum*. Для водорослей *Synechococcus* sp. штамм BS 9001 и *I. galban* накопление ФНВ существенно меньше, даже на фоне интенсивного лизиса клеток, что говорит о быстрой дезинтеграции и растворении разрушенных фрагментов клеток.

Показано, что в условиях длительного стационарного состояния повышение доли ФНВ, вероятно, связано с высокой плотностью культуры, а не с дефицитом минерального питания. Размер частиц ФНВ (*P. tricornutum*) варьирует в широких пределах: от величин, превышающих размер самих клеток до частиц менее 1 мкм³. Доля мелких фракций в общем объёме взвеси была максимальна при росте на невысокой освещённости, а при 900 мкЭ м⁻² · с⁻¹ возрастала доля частиц объёмом от 10 до 50 мкм³.

ГЛАВА 4 ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОРΟΣЛЕЙ В КУЛЬТУРАХ

4.1 Оценка функционального состояния водорослей методами проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*

Метод проточной цитометрии и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* широко используются в практике гидробиологических исследований и позволяют изучать отдельные стороны функциональной активности водорослей в тех или иных условиях.

В связи с этим был проведён ряд экспериментов с целью, исследовать физиологическое состояние культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* с помощью указанных методов.

Динамика общей численности и удельная скорость роста μ накопительной культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* представлена на рисунке 4.1, изменение метаболической активности FDA_{fl} и относительного коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* на рисунке 4.2. Максимальные значения исследуемых параметров наблюдались в экспоненциальной фазе роста, на вторые – третьи сутки эксперимента, после лаг - периода, связанного с разведением культуры. Затем наблюдалось быстрое падение удельной скорости роста μ водорослей и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* (Fv/Fm). Значения FDA_{fl} оставались высокими до наступления стационарной фазы роста.

По мере развития стационарной фазы (старение культуры) на фоне снижения концентрации клеток происходило более быстрое падение показателя FDA_{fl} , однако не столь значительное, как для параметров Fv/Fm и μ соответственно.

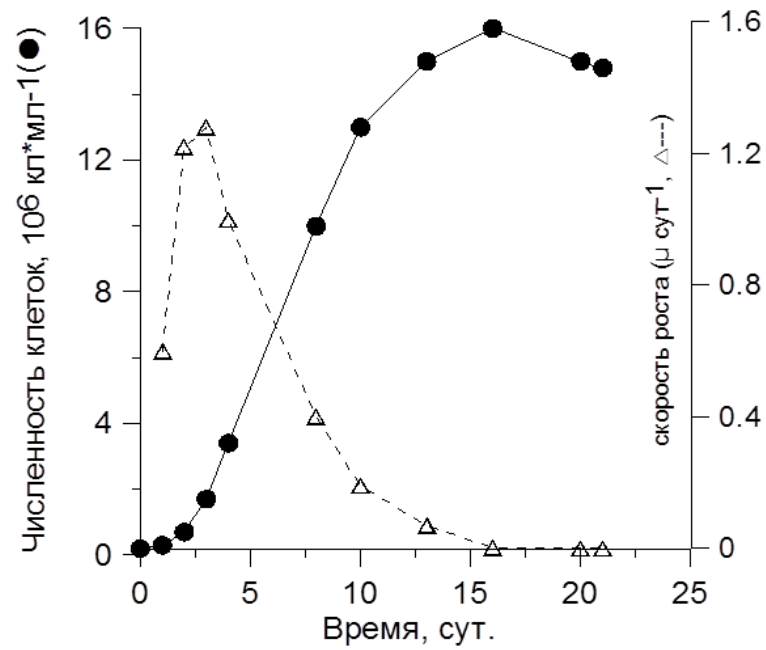


Рисунок 4.1 - Динамика общей численности, удельной скорости роста в накопительной культуре *Chlorella vulgaris suboblonga*

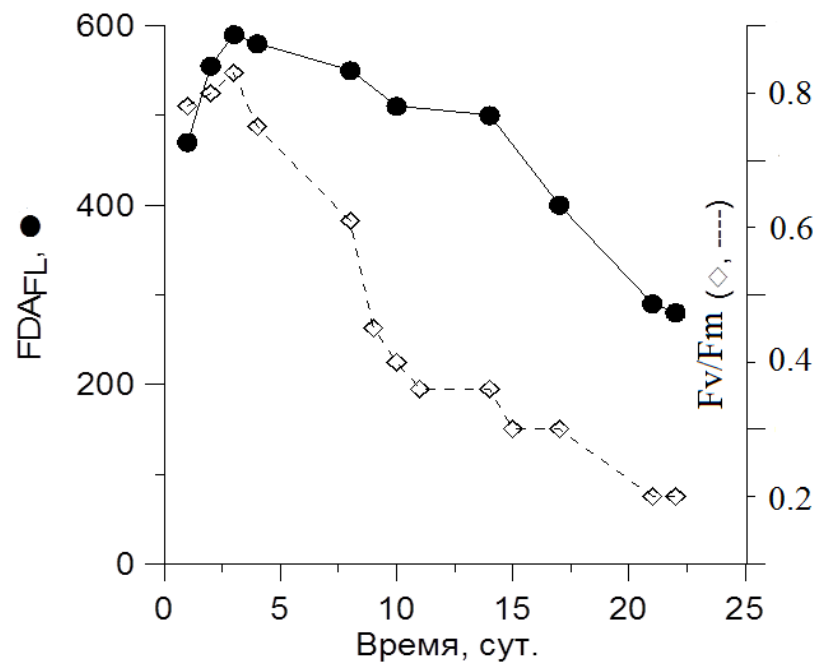


Рисунок 4.2 - Изменение показателей FDA_{fl} и F_v/F_m в накопительной культуре *Chlorella vulgaris suboblonga*

Между удельной скоростью роста водорослей и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* наблюдается положительная корреляционная связь ($R^2=0,9$, рисунок 4.3А). Достоверной линейной связи между удельной скоростью роста и FDA_{fl} не наблюдалось (рисунок 4.3Б); возможно, это связано с тем, что при отсутствии роста клетки водорослей остаются живыми, но переходят в малоактивное состояние.

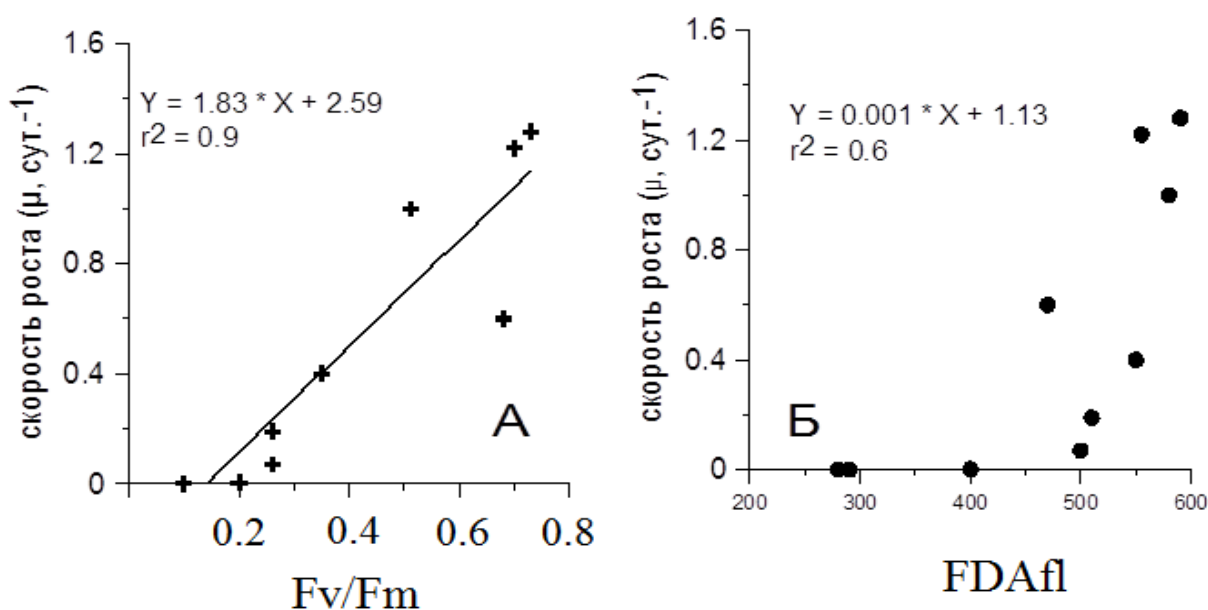


Рисунок 4.3 - Зависимость удельной скорости роста μ (сут.^{-1}) от коэффициента относительной переменной флуоресценции хлорофилла (А); удельной скорости роста μ (сут.^{-1}) от метаболической активности FDA_{fl} (Б) в накопительной культуре

После разведения стационарной культуры свежей средой в 20 раз наблюдали рост водорослей и динамику параметров F_v/F_m и FDA_{fl} на трех освещённостях: насыщающей фотосинтез ($250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и двух лимитирующих ($50 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). На рисунке 4.4 представлены кривые роста культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* при трех интенсивностях света. Как видно из данного рисунка, за период эксперимента водоросли достигли стационарной фазы на $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, при $50 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ находились близко к стационарной фазе и в экспоненциальной фазе роста - при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

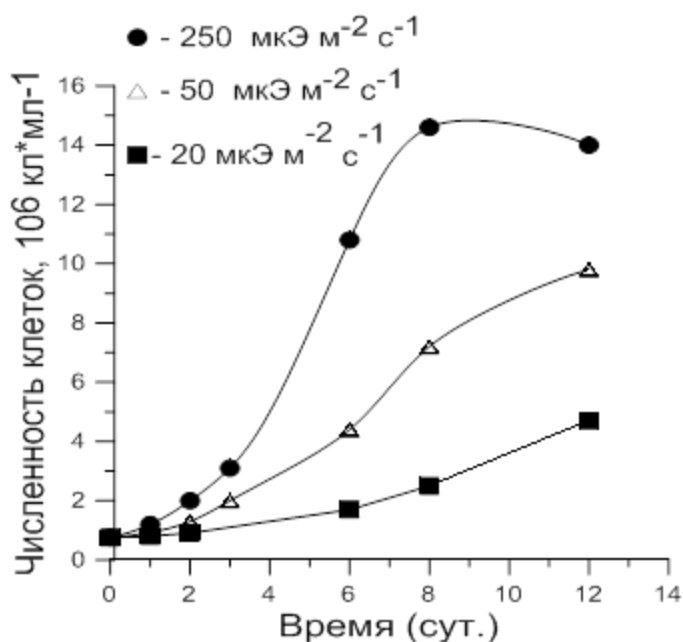


Рисунок 4.4 - Динамика численности клеток культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* при трех уровнях освещенности

На рисунке 4.5 представлена динамика изменения FDA_{fl} , относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и удельной скорости роста μ (сут.⁻¹) непосредственно после разведения стационарной культуры. Наиболее быстрый рост скорости деления водорослей происходил в условиях высокой освещенности, где максимальные значения наблюдались на первые - вторые сутки; при освещенности $50 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ экспоненциальный рост отмечался на третьи сутки, а в условиях сильного светового лимитирования ($20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) - на седьмые-восьмые сутки эксперимента.

Восстановление FDA_{fl} запаздывает по отношению к росту других исследуемых параметров. Наиболее быстрый рост FDA_{fl} наблюдался при $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. При этой интенсивности света максимум FDA активности достигается на четвертые сутки, а на двух других освещенностях - примерно на восьмые. Во всех опытах наблюдается лаг-фаза в течение первых двух суток после изменения условий. После периода восстановления значения FDA флуоресценции остаются высокими в течение эксперимента, с тенденцией к снижению в условиях стационарной фазы при $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и повышению в экспоненциальной фазе

роста при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

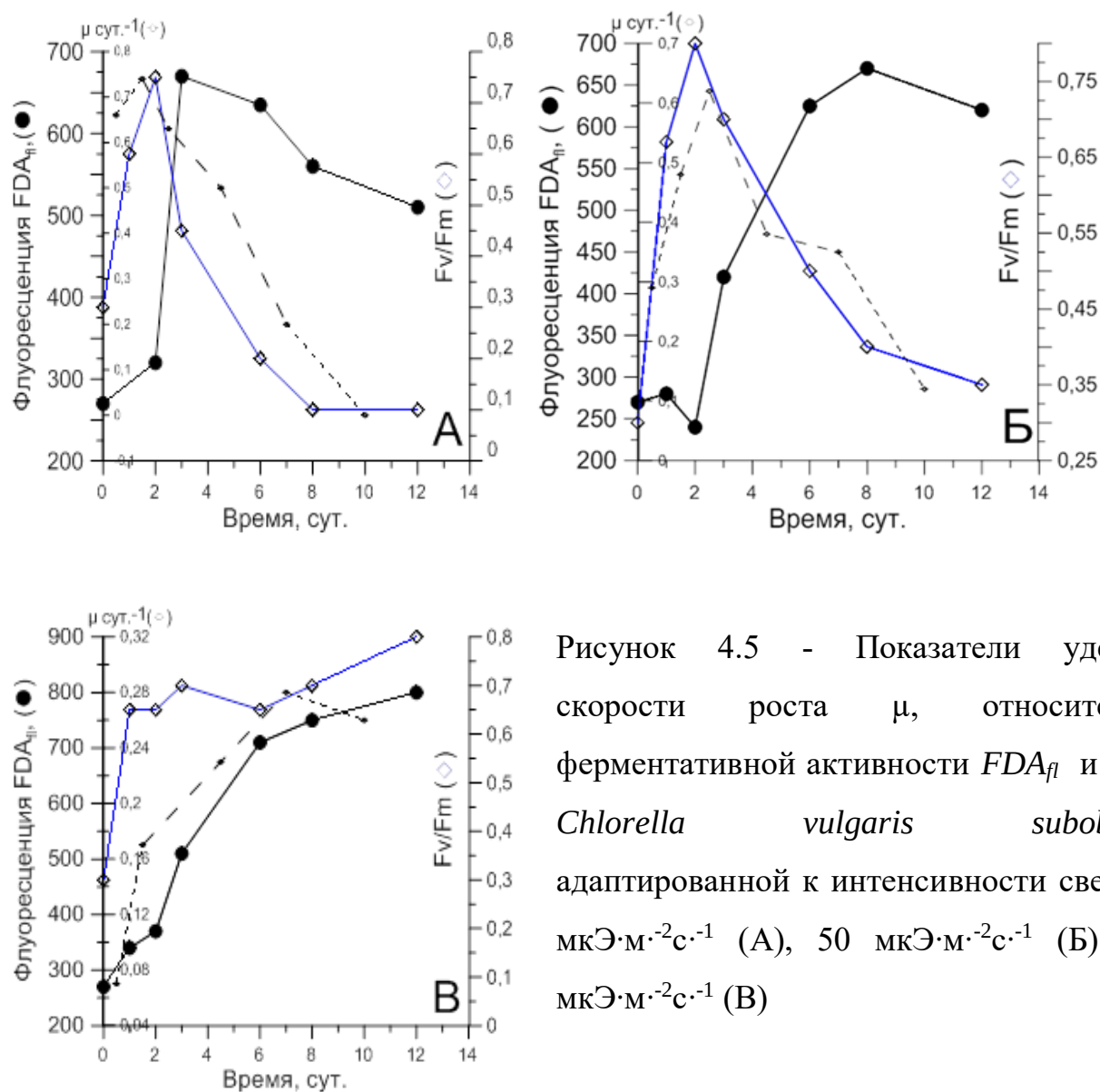


Рисунок 4.5 - Показатели удельной скорости роста μ , относительной ферментативной активности FDA_{fl} и F_v/F_m *Chlorella vulgaris suboblunga*, адаптированной к интенсивности света $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А), $50 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Б) и $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (В)

Как и в случае исходной, накопительной культуры наблюдается положительная корреляция между значениями удельной скорости роста и относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*, что показано на рисунке 4.6

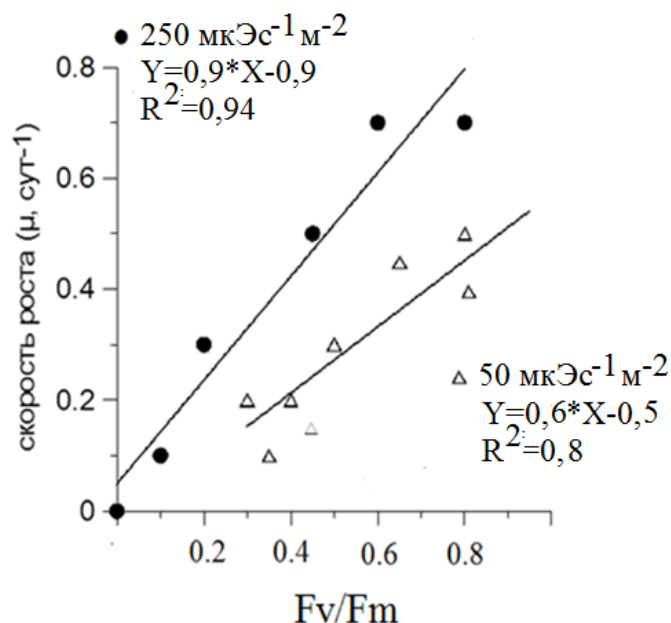


Рисунок 4.6 - Связь между удельной скоростью роста водорослей μ (сут. $^{-1}$) и F_v/F_m при двух интенсивностях света

Рассматриваемые в работе параметры представляют разные стороны функциональной активности водорослей. Относительная переменная флуоресценция хлорофилла отражает эффективность самых первых стадий трансформации световой энергии в химическую макроэнергетических связей. Флуоресценция FDA показывает активность ферментов группы эстераз, которые участвуют в более поздних стадиях преобразования запасенной химической энергии.

Полученные результаты свидетельствует о высокой чувствительности параметра F_v/F_m к факторам, ингибирующим рост водорослей в накопительной культуре. Снижение этого параметра происходит после выхода исследуемой популяции из экспоненциальной фазы роста и падает до значений 0,2 при отсутствии скорости роста водорослей. Эти значения указывают на продолжающийся процесс утилизации световой энергии, хотя и с низкой эффективностью.

В накопительном режиме роста водорослей увеличение концентрации клеток происходит на фоне снижения концентрации питательных веществ в

среде, приводящим к лимитированию фотосинтеза и скорости роста культуры водорослей. В этой связи можно отметить, что характер наблюдаемых изменений величины F_v/F_m аналогичен тем, которые отмечаются в литературе в экспериментах при дефиците биогенных элементов в среде. В ряде работ показано, что уровень обеспеченности биогенами влияет на величину относительной переменной флуоресценции хлорофилла и эффективность работы ФС2. В частности, отмечается падение показателя относительной переменной флуоресценции хлорофилла при недостатке минерального азота в среде для культур водорослей [138, 140], азота и железа - для природных популяций [123]. После переноса водорослей в свежую питательную среду f/2, происходит быстрое восстановление работы ФС2. Скорость роста также возрастает, однако, с некоторым запозданием по отношению к параметру F_v/F_m . Это соответствует последовательности событий – сначала восстановление эффективности фотосинтеза, затем рост клеток. Аналогичная закономерность наблюдалась в частности для *Thalassiosira weissflogii*, где росту клеток предшествует увеличение относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* [20]. Характер динамики и быстрота восстановления относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и скорости роста позволяют сделать заключение, что после улучшений условий наблюдается быстрое восстановление активности реакционных центров ФС2 и роста водорослей, что показано на рисунке 4.5.

Принципиально другой характер изменений наблюдался при измерении активности ферментов группы эстераз. Факторы, приводящие к снижению скорости роста и коэффициента F_v/F_m , в условиях накопительного роста мало влияли на активность этих ферментов, хотя некоторое воздействие условий стационарного состояния все же наблюдалось. Максимальное снижение удельной ферментативной активности (всего в два раза) наблюдалось при существенном старении культуры, когда происходило снижение общей концентрации клеток, вероятно, вследствие лизиса (рисунок 4.2). Аналогичные результаты были получены [112], когда падение ферментативной активности клеток *Thalassiosira weissflogii*, адаптированной к различным температурным и световым условиям,

отмечали после выхода культуры в стационарную фазу роста.

После разведения культуры на всех освещенностях наблюдался двухсуточный лаг-период, после которого ферментативная активность возрастала примерно, в те же два раза, во сколько она упала в исходной накопительной культуре. Скорость восстановления зависела от уровня заданной освещенности: при интенсивности света $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдали увеличение флуоресценции FDA на 2–3 сутки, тогда как при освещенности $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – на 5–7 сутки эксперимента. В опытах хорошо видна устойчивость величины FDA_{fl} после периода восстановления. Во всем диапазоне изменения плотности культур (и при переходе к стационарному состоянию) отмечались незначительные изменения FDA_{fl} , которые соответствовали степени развития стационарного состояния: понижение при $250 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и, наоборот, повышение при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (рисунок 4.5). При этом FDA_{fl} , как показатель ферментативной активности не коррелирует с функциональными изменениями, которые связаны со скоростью роста. Нам представляется, что величина FDA_{fl} может служить индикатором только летальных воздействий на клетки водорослей и оценки соотношения живых и неактивных, мёртвых клеток в популяции, что согласуется и с литературными данными [118, 166, 151].

4.2 Исследование изменчивости параметров флуоресценции при различных условиях культивирования *Phaeodactylum tricornutum*

В настоящем разделе работы представлены результаты исследования возможности применения относительного коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* и флуоресценции FDA_{fl} для оценки состояния *Phaeodactylum tricornutum* в различных условиях роста культуры, а также их сопоставление с показателями, полученными стандартными методами, такими как скорость роста и структурные внутриклеточные соотношения.

На рисунке 4.7 представлена временная динамика изменений концентрации органического углерода и удельной скорости роста *Phaeodactylum tricornutum* в накопительной культуре. На рисунке 4.8 представлены изменения относительных внутриклеточных концентраций хлорофилла *a* и азота (C/X_{cl} , C/N) и максимальной квантовой эффективности фотосинтеза F_v/F_m в процессе такого роста. На участке экспоненциального роста и в фазе его начального замедления наблюдались минимальные значения отношений C/X_{cl} и C/N , характеризующие высокое внутриклеточное содержание хлорофилла и азота, а также высокий коэффициент квантовой эффективности фотосинтеза.

Начиная с 6-8 суток роста, наблюдалось 2-х и 4-х кратное возрастание отношений C/X_{cl} и C/N соответственно при достижении стационарной фазы, что свидетельствует о критическом уровне азотного лимитирования [192]. В этот же период развития накопительной культуры наблюдалось снижение F_v/F_m до значений 0,2.

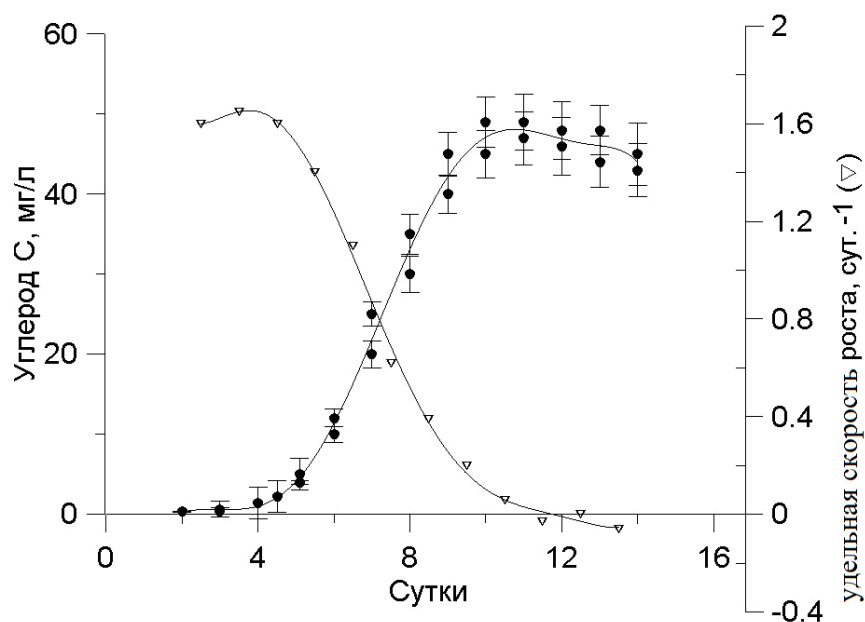


Рисунок 4.7 - Динамика концентрации органического углерода и удельной скорости роста *P. tricornutum* в накопительном режиме (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный t-test)

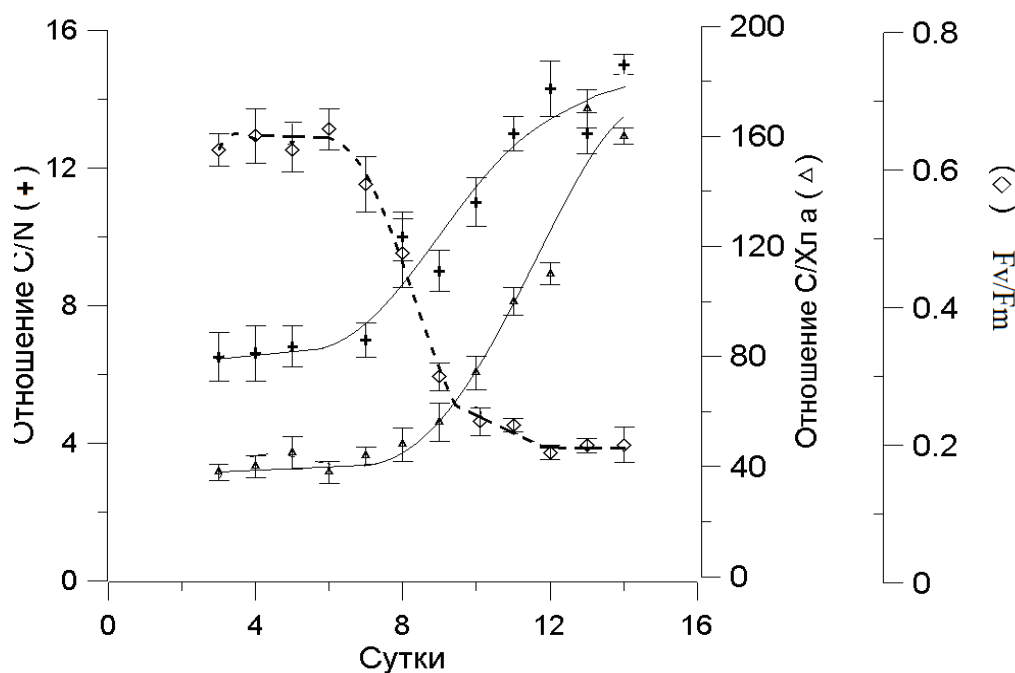


Рисунок 4.8 - Изменение относительных внутриклеточных концентраций хлорофилла *a* и азота ($C/Xl\ a$, C/N) и величины Fv/Fm в процессе накопительного роста *P. tricornutum* (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный t-test)

Данные, представленные на рисунке 4.9, показывают соотношения между величиной Fv/Fm , флуоресценции FDA и удельной скоростью роста (рисунок 4.9А), а также отношений C/Xl и C/N и удельной скоростью роста (рисунок 4.9Б). Как видно из рисунков, удельное содержание хлорофилла *a* и величина Fv/Fm слабо изменяются в диапазоне скоростей роста водорослей от 1,7 до примерно 0,5 сут.⁻¹, а при дальнейшем увеличении плотности культуры и замедлении скорости роста быстро падают.

Взаимосвязь между величиной отношения C/N и скоростью роста имела вид близкий к логарифмической зависимости; заметное уменьшение внутриклеточной концентрации азота наблюдалось при скоростях роста меньше 1 сут.⁻¹

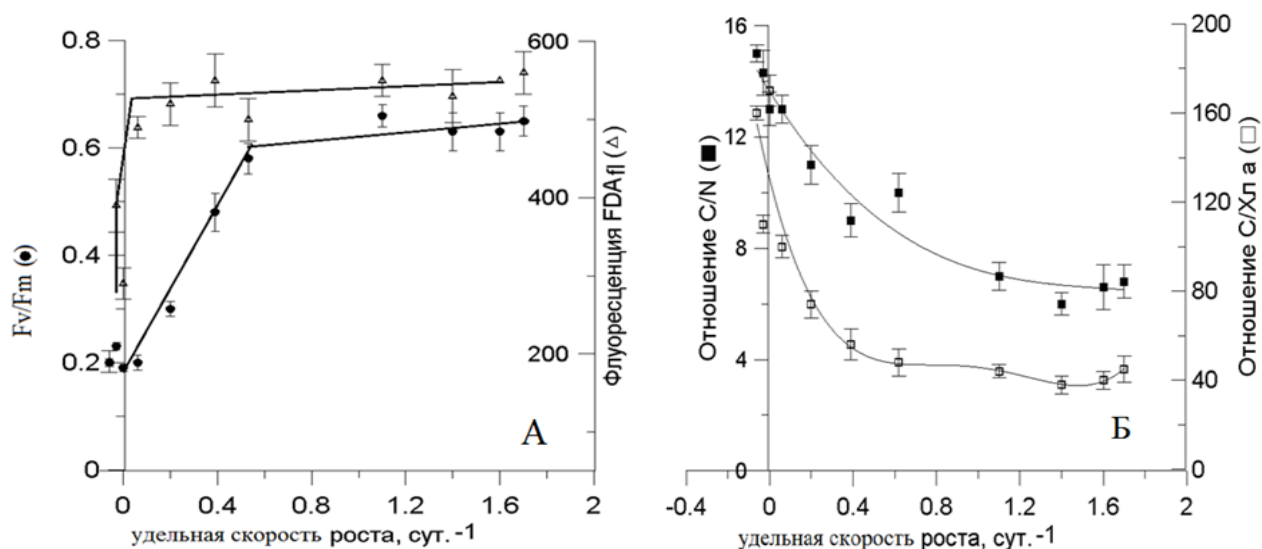


Рисунок 4.9 - Соотношения между Fv/Fm и удельной скоростью роста, FDA_{fl} (А), отношениями C/N , $C/Хл а$ и удельной скоростью роста (Б) (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный t-test)

Таким образом, величина максимальной квантовой эффективности фотосинтеза может служить индикатором начала азотного голодания при 3-х - 4-х кратном снижении скорости роста, что связано с изменениями внутриклеточных концентраций азота и хлорофилла на этом уровне лимитирования (рисунок 4.10).

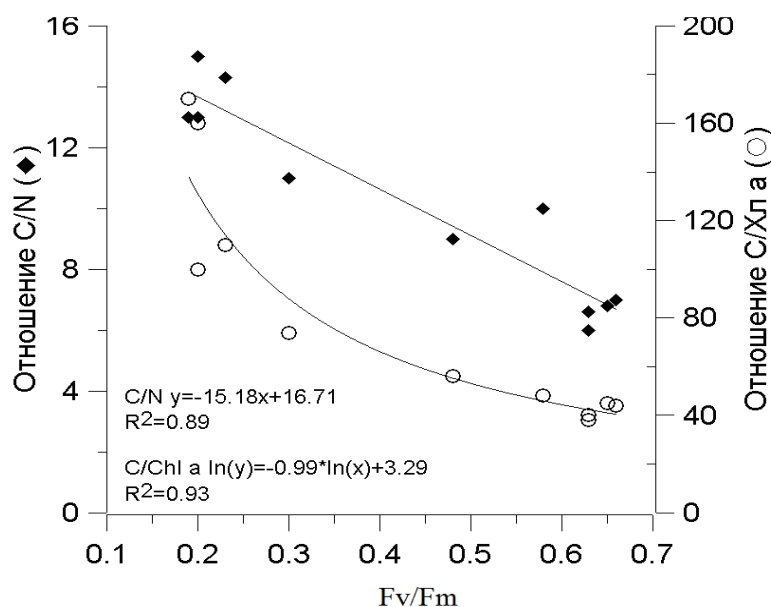


Рисунок 4.10 - Связь между отношениями C/N , $C/Хл$ и Fv/Fm

Такой же характер взаимосвязи относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и лимитирующими концентрациями содержания азота в среде отмечается в литературе и для других видов водорослей, в частности для *Phaeodactylum tricornutum* [116, 149, 11, 24]. Вместе с тем, [172] установлено, что в условиях непрерывной культуры и при достаточно длительной акклимации водорослей и стабилизации скорости роста, связь между показателем квантовой эффективности фотосинтеза и степенью лимитации азотом может отсутствовать. При этом авторы отмечают, что в природных условиях такая стабилизация недостижима в силу непрерывной изменчивости внешних факторов и указывают на возможную роль методических аспектов в этом вопросе.

Величина FDA_{fl} сохраняла высокие значения в широком диапазоне накопительного режима, вплоть до полной остановки роста и последующего лизиса клеток на поздней стадии стационарной фазы. В разделе 4.1 настоящей главы для *Chlorella vulgaris suboblonga* также показано, что падение активности внутриклеточных эстераз происходит лишь на поздних стадиях старения и лизиса культуры. Использование методов флуоресценции FDA, как показателя жизнеспособности водорослей в условиях дефицита элементов минерального питания описано в ряде работ [83, 101]. Так в работе [145] для трех видов водорослей наблюдалось длительное поддержание ферментативной активности в стационарной фазе, при дефиците как азота и фосфора, определяемой методом FDA флуоресценции. Как и в нашем случае, авторы наблюдали снижение параметра Fv/Fm на фоне высокого уровня флуоресценции FDA.

Влияние светового фактора

В диапазоне интенсивности света от 14 до $150 \cdot \text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ у *Phaeodactylum tricornutum* сохранялись высокие значения квантовой эффективности ФС2 (0,63–0,70). Эти величины близки к максимальным значениям этого параметра, приводимым в литературе, как для культур водорослей, так и для природных сообществ фитопланктона, вегетирующего в оптимальных условиях [142, 172]. Повышение освещенности от 150 до $600 \cdot \text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ приводило к снижению

значений коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* до 0,45–0,55, при освещенности выше $800 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось еще более быстрое снижение величины F_v/F_m до 0,2 – 0,3 (рисунок 4.11).

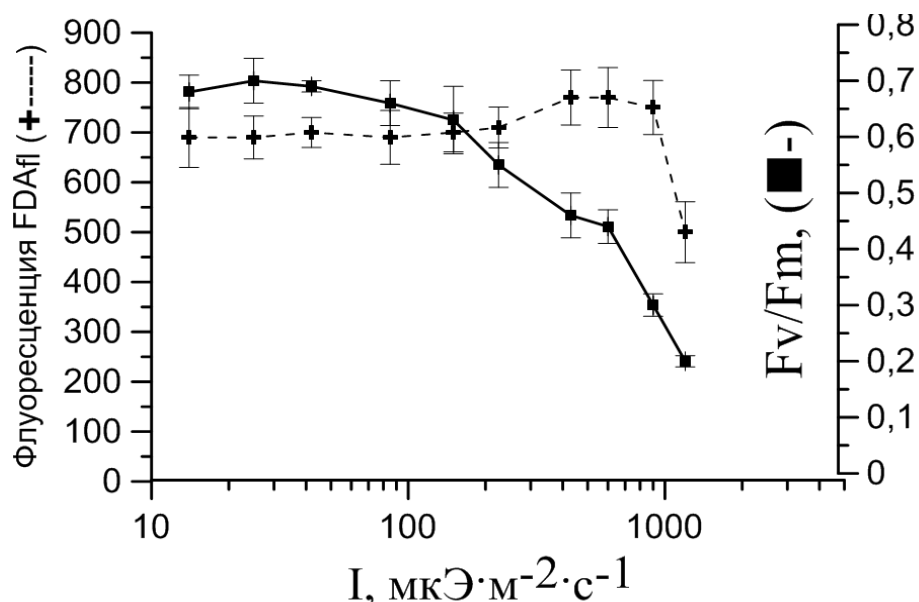


Рисунок 4.11 - Зависимость F_v/F_m и FDA_{fl} активности *Phaeodactylum tricornutum* от интенсивности света (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный t-test)

Отметим, что освещенность порядка $150 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ является насыщающей для роста и фотосинтеза многих видов водорослей [57]. Уровень световой энергии выше этих значений может считаться избыточным (адаптивное снижение удельного содержания хлорофилла *a*), а затем и ингибирующим при 600-1000 $\text{мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, вызывающим интенсивное фотоокисление и деструкцию, как светопоглощающих пигментов, так и реакционных центров [139, 178]. Это, как видно, находит свое отражение в усиливающемся падении эффективности первичных фотохимических стадий фотосинтеза при увеличении светового фактора. В работе [188] снижение величины отношения F_v/F_m для одного из вида динофитовых водорослей наблюдалось при освещенностях выше $100\text{--}300 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

На рисунке 4.12 представлены световые зависимости скорости роста и отношения C/X_l водорослей. В диапазоне от 14 до $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ отношение

C/X_l увеличивалось от 15 до 85 по параболической зависимости. При освещенностях выше $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось более резкое снижение концентрации хлорофилла и скорости роста водорослей. Из сопоставления рисунков 4.11 и 4.13 можно видеть, что, как и в случае накопительной культуры, наблюдаемые изменения величин C/X_l и F_v/F_m имеют разнонаправленный характер, однако в этом случае снижение относительной квантовой эффективности не было связано с падением скорости роста (до $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). По данным [23] снижение квантовой эффективности в таких случаях вызывается снижением количества реакционных центров ФС2, а также увеличением нефотохимического тушения флуоресценции.

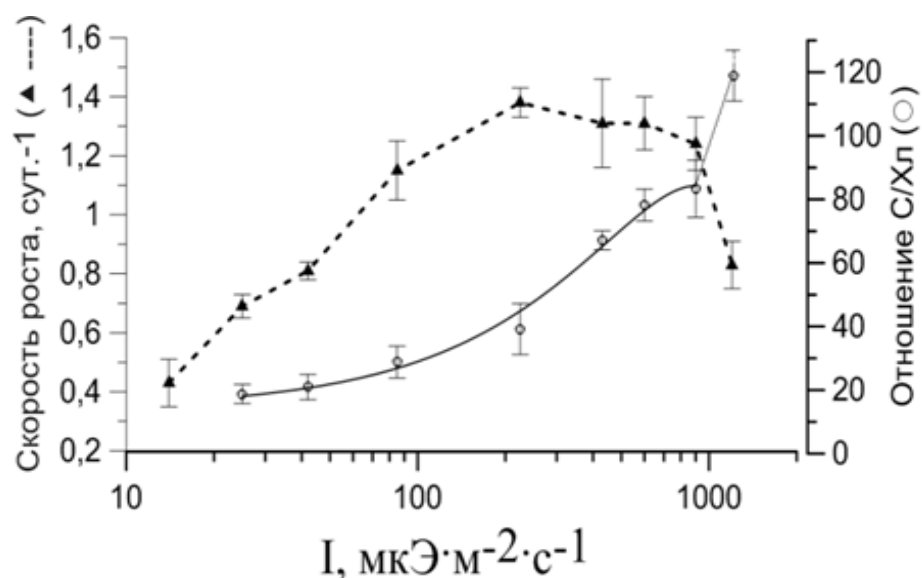


Рисунок 4.12 - Зависимость удельной скорости роста и отношения C/X_l а от интенсивности света у *P. tricornutum* (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный t-test)

Флуоресценция FDA_l слабо зависела от освещенности в диапазоне от 14 до $900 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. При $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось снижение данного показателя, однако, не столь значительное, как для коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a* (рисунок 4.11). Аналогичные изменения наблюдаются в исследованиях по влиянию стрессовых значений различных факторов, в частности, ядов и загрязнений, не всегда связанных с изменениями

функционального состояния водорослей в толерантной зоне [48, 98, 146, 179, 180, 184].

Влияние температурного фактора

Данные, представленные на рисунке 4.13, показывают значения коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *a*, удельной флуоресценции FDA_f и удельной скорости роста при культивировании водорослей в различных температурных условиях. Зависимость удельной скорости роста имела одновершинный характер с максимумом при 20-24 °С и сильным ингибированием при 27 °С.

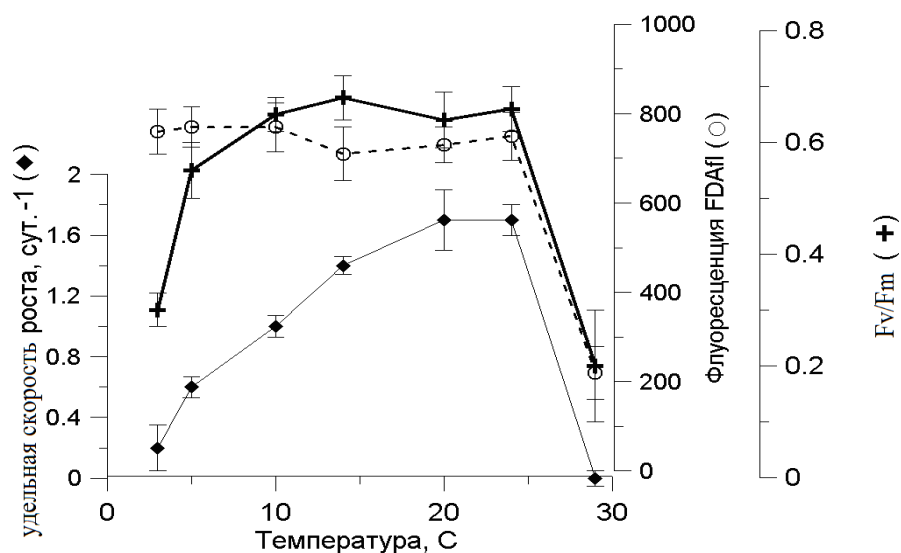


Рисунок 4.13 - Зависимость удельной скорости роста, Fv/Fm , флуоресценции FDA от температуры у *P. tricornutum* (стандартные отклонения по четырем повторностям, $p < 0,05$, непарный *t*-test)

Значения удельной флуоресценции FDA_f и коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла *Phaeodactylum tricornutum* сохранялись на высоком, относительно постоянном уровне в диапазоне выращивания 5-24 °С. При температуре 27 °С культура деградирует, что приводит к остановке роста и

падает, как ферментативная активность, так и эффективность переноса энергии ФС2. Пролонгированное воздействие этой температуры имело летальный характер. При 3°C длительное культивирование приводило к замедлению скорости роста и снижению максимальной эффективности фотосинтеза, что, однако, не сказывалось на жизнеспособности водорослей и, в отличие от 27 °C, имело обратимый характер для обоих показателей. Имеющиеся в литературе данные подтверждают, что коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла *a* не зависит, или слабо изменяется в толерантном диапазоне температур и для других видов водорослей (*Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa*, два штамма *Microcystis aeruginosa*) [88], но приводятся и другие результаты, где показан куполообразный вид зависимости с максимумом при оптимальных температурах [219]. В отличие от переменной флуоресценции хлорофилла *a*, активность FDA_{fl} сохраняла высокие значения при низкой температуре, что косвенно подтверждает поддержание жизнеспособности водорослей в этих условиях.

Таким образом, было проведено исследование относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* водорослей, связанной с первичными фотохимическими реакциями (F_v/F_m) и аккумулятивной флуоресценции FDA (активность внутриклеточных эстераз) в широком диапазоне светового и температурного факторов, а также в условиях азотного лимитирования, как возможных индикаторов контроля физиологического состояния водорослей (на примере *Phaeodactylum tricornutum* и *Chlorella vulgaris suboblonga*).

Результаты экспериментов показали, с одной стороны, устойчивость коэффициента переменной флуоресценции в широком диапазоне световых (рисунок 4.11) и температурных (рисунок 4.13) условий, а с другой - высокую реактивность этого параметра под влиянием экстремальных значений этих факторов. Освещённость выше насыщающей (до 900 мкЭ·м⁻²·с⁻¹) вызывает примерно пропорциональное снижение F_v/F_m при сохранении максимальной скорости роста. При более высоких уровнях освещенности и температуры (выше

1200 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ и 27 °С соответственно) переменная флуоресценция хлорофилла *a* падает значительно, и это сопряжено с ингибированием роста водорослей и фотоокислением хлорофилла *a*.

В накопительном режиме, при изменении уровня азотного лимитирования величина F_v/F_m начинает отклик при 3-х, 4-х кратном снижении роста, что связано и сопутствующим снижениям внутриклеточных пулов азота и хлорофилла. В этом отношении коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла *a* может служить параметром контроля использования лимитирующего фактора среды.

Показано, что величина флуоресценции FDA - более устойчивый параметр по сравнению с коэффициентом переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Относительно высокий уровень ферментативного гидролиза в клетках сохраняется при значительном исчерпании внутриклеточных запасов азота, остановки скорости роста и синтеза хлорофилла *a*. Величины светового и температурного факторов начинают влиять на FDA_l при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним характер. Это позволяет использовать метод флуоресценции FDA как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПО ВАРИАБЕЛЬНОСТИ РАЗМЕРНОГО СПЕКТРА КЛЕТОК

5.1 Влияние интенсивности света на вариабельность размерного спектра водорослей

Размер клеток фитопланктона и их внутриклеточный состав являются физиологическими признаками, отражающими функциональное состояние водорослей. Различие в размерном составе клеток может свидетельствовать об их функциональной неоднородности в пределах одной популяции. В пионерской работе [56] на примере цианобактерий показана неоднородность популяций, обусловленная отмиранием клеток в культурах.

Для описания морфологических изменений в культурах водорослей в процессе их роста использовались такие параметры, как средняя длина и ширина клеток, объем клеток, вариабельность которого может косвенным путем указывать на изменение функционального состояния клеток.

Цель экспериментов заключалась в определении вариабельности объемов клеток водорослей в зависимости от освещённости и температуры.

У культуры *Chaetoceros affinis*, адаптированной к $43 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и $206 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (таблица 5.1), изменялись длина и ширина клеток. Средняя длина клеток при низкой освещённости составила 21 ± 6 мкм, ширина – 10 ± 4 мкм; при высокой освещённости – 27 ± 7 мкм, и $21,5 \pm 3,6$ мкм соответственно. Наиболее значительное увеличение клеточного объёма водорослей наблюдалось в стационарной фазе роста при адаптации к $206 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (рисунок 5.1А, таблица 5.1). Гетерогенность объёма клеток микроводорослей зависела от их длины и ширины. Стационарная фаза роста культуры: на пятые сутки при низкой, и на третьи сутки

при высокой интенсивностях света, привела к максимальным значениям коэффициента вариации 40 % и 55 % соответственно (таблица 5.1).

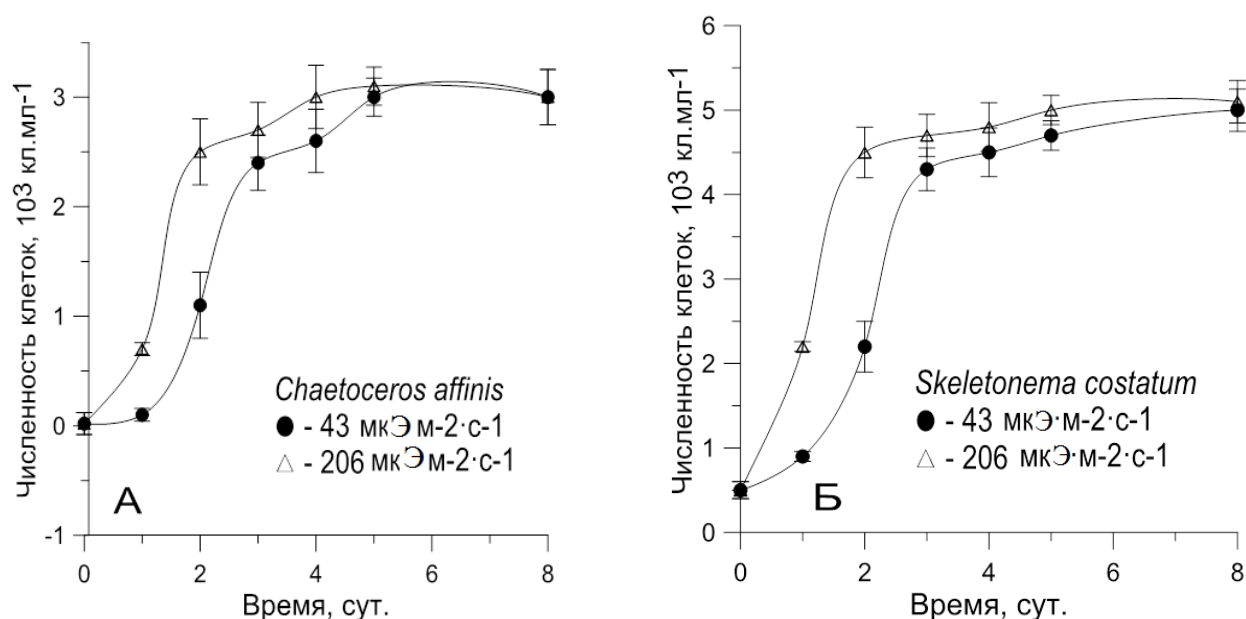


Рисунок 5.1 – Динамика общей численности в накопительных культурах *Chaetoceros affinis* (А) и *Skeletonema costatum* (Б) при двух освещённостях

У *Skeletonema costatum* наблюдали вариабельность размерного спектра клеток при низкой и высокой интенсивностях света только по высоте клеток, однако средние значения высоты клеток не отличались при заданных в эксперименте уровнях света и составили $15 \pm 4,2$ мкм и $17 \pm 4,5$ мкм соответственно. Максимальные значения CV объема клеток наблюдали в начале стационарной фазы роста (таблица 5.1).

В зависимости от интенсивности света и стадии роста у *Heterocapsa triquetrum* средний объём клеток варьировал от $1 \cdot 10^3 \pm 0,3 \cdot 10^3$ до $2,5 \cdot 10^3 \pm 1,2 \cdot 10^3$ мкм³. Наибольший средний объём клеток $2,5 \cdot 10^3$ мкм³ получен при насыщающем уровне освещенности, когда культура находилась в глубокой стационарной фазе роста (рисунок 5.2, таблица 5.2). У водоросли, адаптированной к низкой интенсивности света, средний объём клеток был в 2 раза ниже и практически не изменялся в течение всего эксперимента (таблица 5.2).

Таблица 5.1 – Изменение объёмов клеток диатомовых водорослей

Chaetoceros affinis						
Сут.	E ₁ , мкЭ·м ⁻² ·с ⁻¹	V, мкм ³ ±SD	CV, %	E ₂ , мкЭ·м ⁻² ·с ⁻¹	V, мкм ³ ±SD	CV, %
1	43	5·10 ³ ±1·10 ³	20	206	5·10 ³ ±1·10 ³	20
2		5·10 ³ ±1·10 ³	20		6·10 ³ ±2·10 ³	30
3		5·10 ³ ±2·10 ³	30		10·10 ³ ±5·10 ³	55
4		6·10 ³ ±2·10 ³	33		10·10 ³ ±3·10 ³	43
5		7·10 ³ ±3·10 ³	40		9·10 ³ ±1·10 ³	15
8		7·10 ³ ±2·10 ³	27		9·10 ³ ±1·10 ³	15
Skeletonema costatum						
1	43	309±82	18	206	341±97	28
2		342±93	27		455±130	28
3		437±114	26		463±132	28
4		443±116	26		470±151	32
5		450±135	30		472±156	33
8		458±138	30		488±162	33

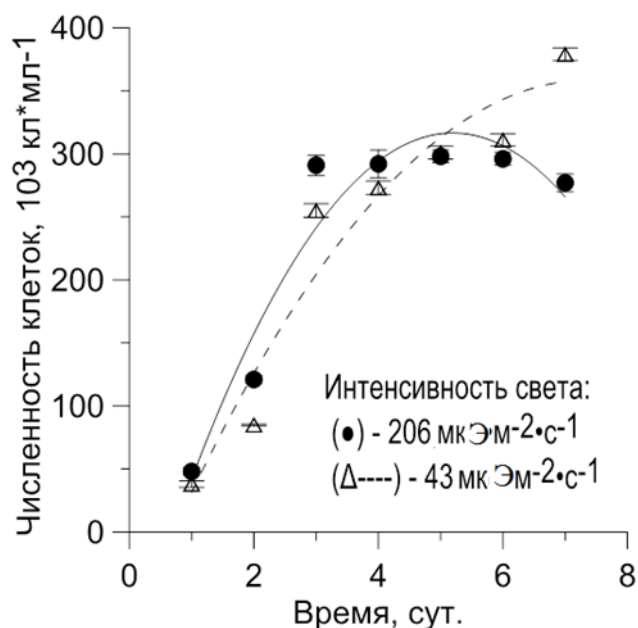


Рисунок 5.2 – Динамика численности *Heterocapsa triquetrum*

Метод проточной цитометрии позволяет определить дисперсию у исследуемых групп водорослей, как по размерам (боковое рассеяние FS), так и по автофлуоресценции клеток (FL4). Об увеличении размеров клеток водорослей свидетельствуют сдвиги кластеров вправо в системе координат FS-FL4 (рисунки 5.3, 5.4). О величине дисперсии исследуемых параметров можно судить по «вытянутости» кластера по осям абсцисс (FS) и ординат (FL4).

Следует отметить, что анализировалась группа клеток в области А, так как область Б представляет собой клеточные осколки и мёртвые клетки. По мере роста культуры снижалось внутриклеточное содержание пигментов: при освещённости 206 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ падение средних значений автофлуоресценции составило три раза (с 164 от. ед. до 60 от. ед.), при 43 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ отмечалось незначительное падение данного параметра (с 184 от. ед. до 158 от. ед.). Снижение автофлуоресценции клеток водорослей при насыщающей интенсивности света, возможно, связано с фотоокислением и высокими скоростями разрушения пигментов в клетках.

Таблица 5.2 – Изменение объёмов клеток динофитовых водорослей

<i>Heterocapsa triquetrum</i>						
Сут.	E ₁ , мкЭ·м ⁻² ·с ⁻¹	V, мкм ³ ±SD	CV, %	E ₂ , мкЭ·м ⁻² ·с ⁻¹	V, мкм ³ ±SD	CV, %
1	43	1,7±0,4	21	206	3±0.8	25
2		1,4±0,3	22		1±0.3	26
3		1,4±0,3	22		1,6±0,7	45
4		1,4±0,3	21		1,8±0,8	44
5		1,5±0,4	26		2±0,6	30
6		1,6±0,5	31		2,3±0,5	23
7		1,6±0,5	33		2,5±1,2	24
<i>Prorocentrum pusillum</i>						
1	43	66±15	23	206	72±20	28
2		46±14	30		60±18	30
3		47±14	30		47±16	33
4		46±15	31		51±24	47
7		72±23	31		40±19	48
8		79±25	35		40±17	42
14		45±16	35		41±17	40

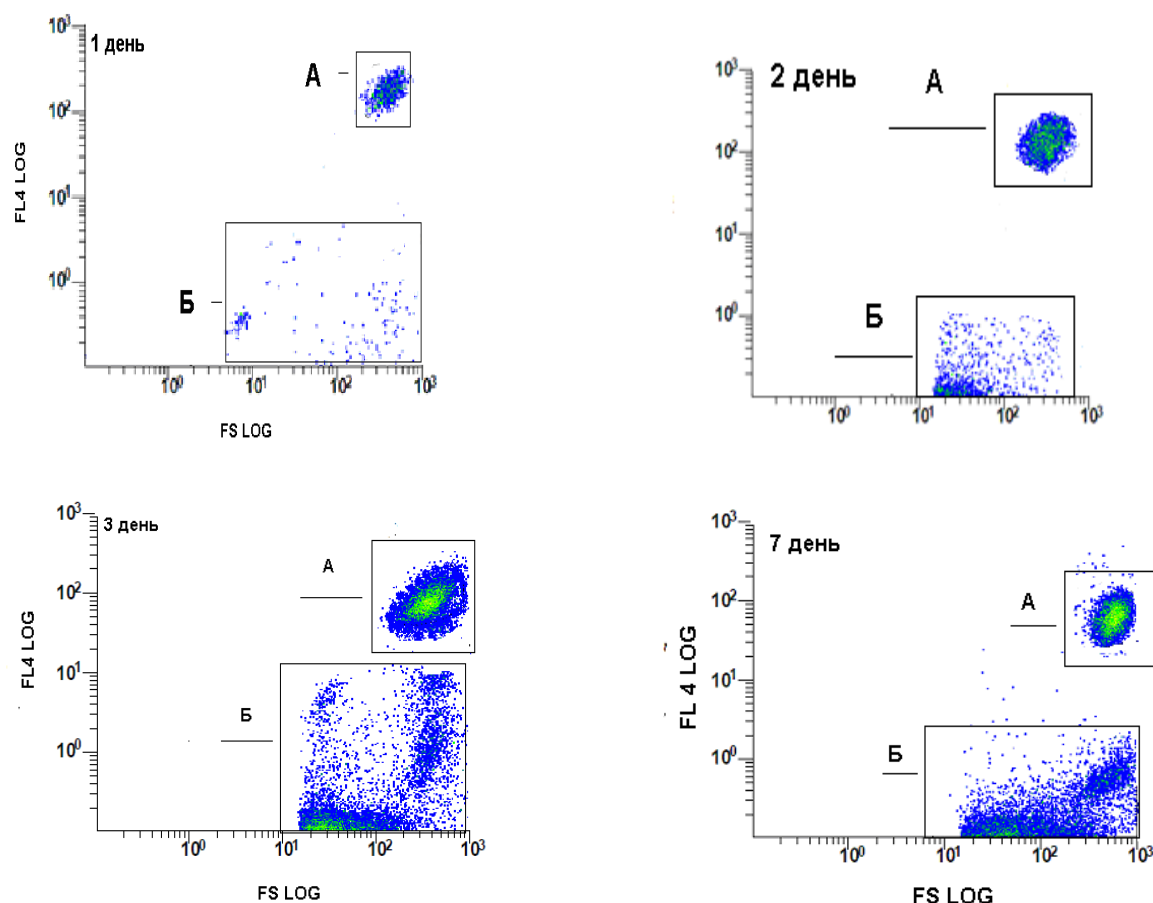


Рисунок 5.3 – Цитогаммы распределения культуры *Heterocapsa triquetrum* в координатах FS LOG (прямое рассеяние) FL4 LOG (автофлуоресценция) при высокой интенсивности света

При лимитирующей освещенности изменчивость клеточного объема, согласно шкале Мамаева [28], была невысокой (таблица 5.2). Однако при адаптации культуры к насыщающей освещенности CV варьировал от 25 % - экспоненциальная фаза роста, до 45 % - стационарная фаза, что говорит об одинаковой ответной реакции с вышеописанными диатомовыми видами: наступление стационарной фазы роста культуры *H. triquetrum* явилось причиной физиологической неоднородности клеток, входящих в её состав. В глубокой стационарной фазе роста (фаза отмирания) наблюдалось уменьшение дисперсии по значениям FS и FL4.

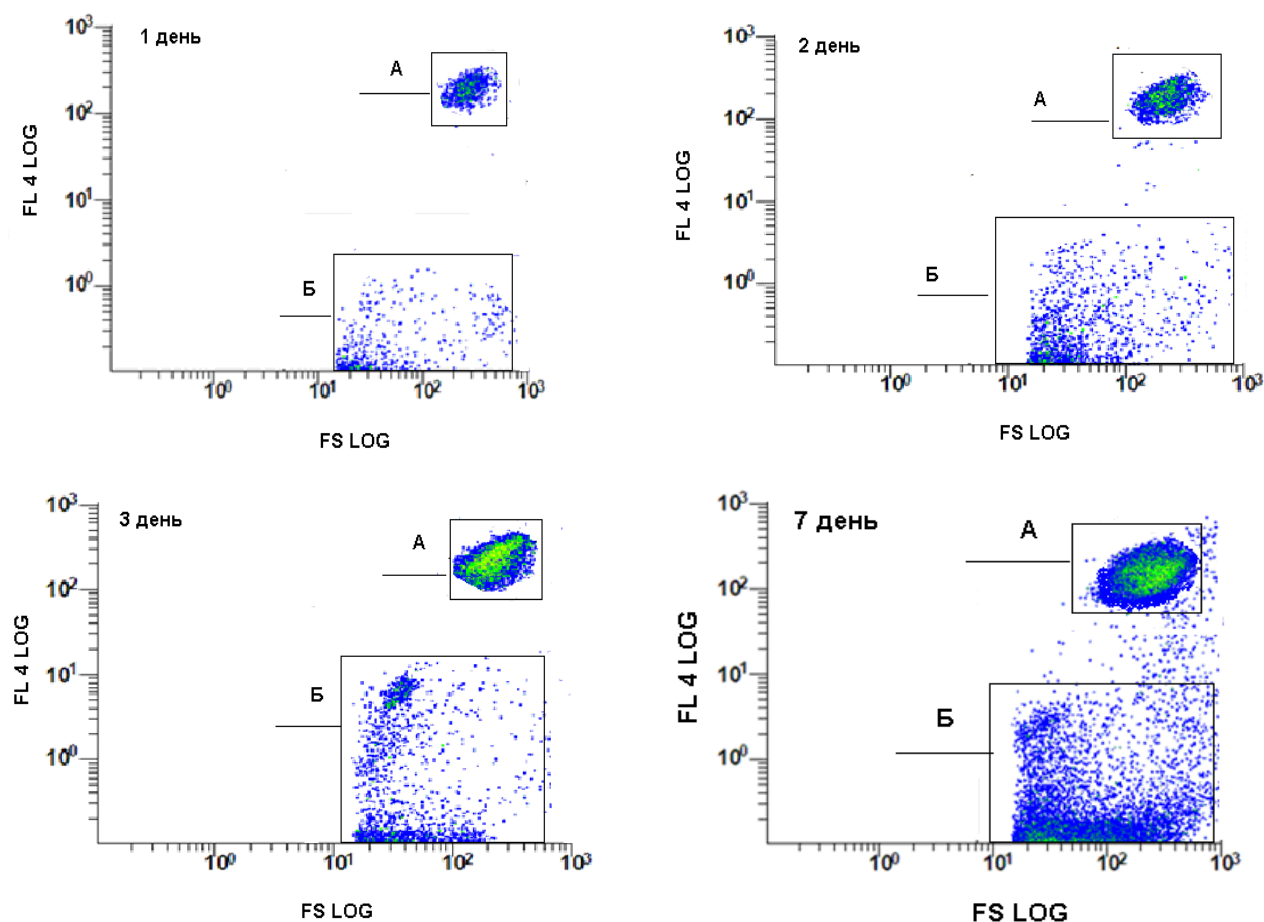


Рисунок 5.4 – Цитогаммы распределения культуры *Heterocapsa triquetrum* в координатах FS LOG (прямое рассеяние) FL4 LOG (автофлуоресценция) при низкой интенсивности света

У *Prorocentrum pusillum* объём клеток варьировал от 40 до 79 $\mu\text{м}^3$ (таблица 5.2). Максимальные значения данного параметра отмечались на первые и восьмые сутки – для 43 $\text{мкЭ м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и первые, четвёртые сутки - для 206 $\text{мкЭ м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. Увеличение объёмов клеток впервые сутки эксперимента при двух интенсивностях света связано с лаг – фазой (задержка клеточного деления и адаптация к новым условиям), на четвёртые и восьмые - с наступлением стационарной фазы роста (рисунок 5.5). При этом более высокие значения объёмов клеток получены при акклимации культуры к 43 $\text{мкЭ м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ (рисунок 5.6).

Гетерогенность размерного спектра клеток водорослей, как и в случае с ранее описанными видами, определялась стадией роста культуры. Насыщающая

освещённость приводила к более быстрому угнетению роста водорослей и к более высокой вариабельности объёмов клеток в начале стационарной фазы роста (CV 47 %), что показано на рисунке 5.6.

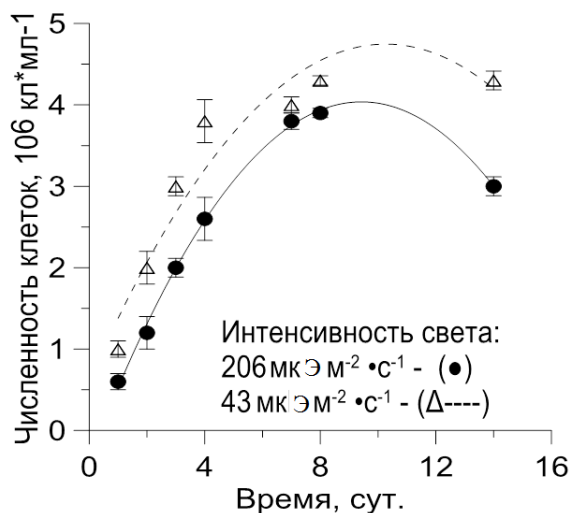


Рисунок 5.5 – Динамика численности *Prorocentrum pusillum*

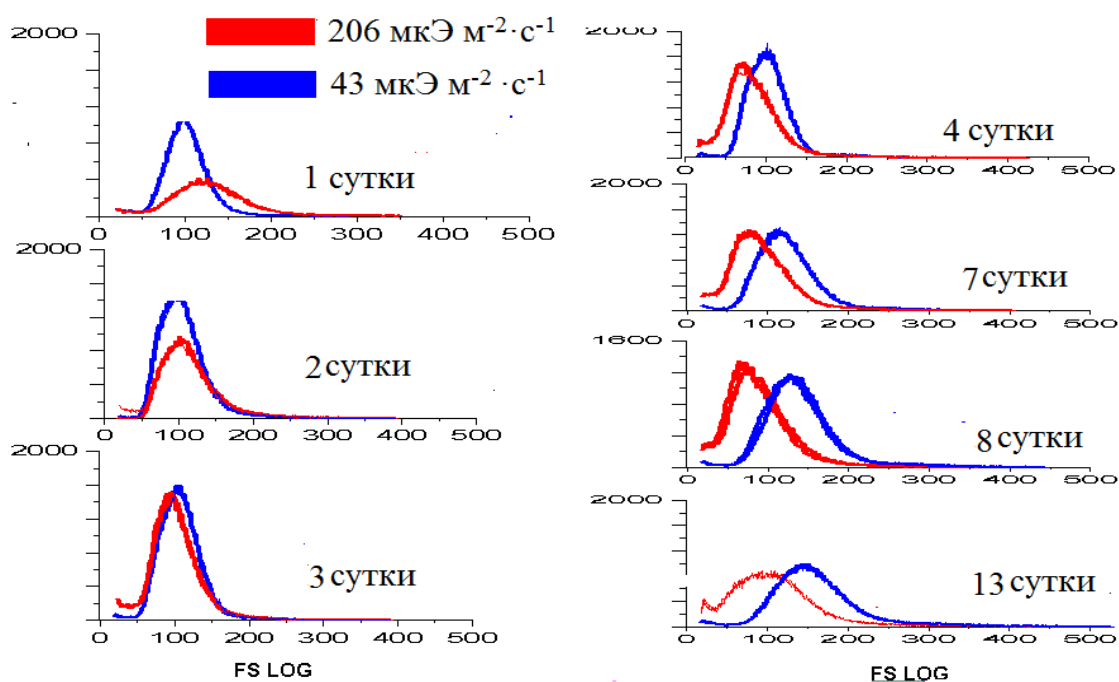


Рисунок 5.6 – Примеры гистограмм распределения по размерам (прямое рассеяние FS) клеток *Prorocentrum pusillum* при двух освещенностях (ось абсцис – боковое рассеяние FS в относительных единицах; ось ординат – количество клеток)

5.2 Влияние температуры на вариабельность размерного спектра водорослей

В данном подразделе представлены результаты, полученные для двух видов микроводорослей, которые были выбраны, исходя из, их особенностей расти в широком температурном диапазоне [47, 68] и достигать высоких плотностей в условиях культивирования. Также данные виды водорослей являются перспективными объектами массового культивирования, активно используются в биотехнологической промышленности [208]. Выбор двух температур (10 °C и 20 °C) обусловлен, тем, что температура 20 °C является оптимальной для *Chlorella vulgaris suboblonga* [68] и *Phaeodactylum tricornutum* [47] соответственно. Температура равная 10 °C выбрана в качестве минимальной, где сохраняется устойчивый рост водорослей.

Динамика концентрации клеток в культурах *C. vulgaris suboblonga* и *P. tricornutum*, адаптированных к температурам 10 °C и 20 °C приведена на рисунке 5.7 Во всех вариантах опыта временной ход увеличения концентрации клеток описывается типичной S-образной кривой. Объёмы клеток вычисляли согласно калибровке, приведенной в главе 2 (рисунок 2.2). При температуре 20 °C лаг-фаза была минимальной, тогда как при адаптации к 10 °C период лаг-фазы водорослей составил восемь и семь суток для *C. vulgaris suboblonga* и *P. tricornutum* соответственно. Изменение объёмов клеток представлено в таблице 5.3.

При акклимации *C. vulgaris suboblonga* к температуре 20 °C не наблюдалось существенных различий в объёмах клеток. При экспоненциальном росте культуры средний объём клеток составил 45 ± 9 мкм³. Отмечалось небольшое уменьшение объёмов клеток в стационарной фазе. Среднее значение объёма клеток *C. vulgaris suboblonga* при адаптации к температуре 10 °C было в 1,5 раза выше в лаг-фазе, что связано с задержкой клеточного деления микроводорослей. По мере роста численности культуры объём клеток оставался неизменным.

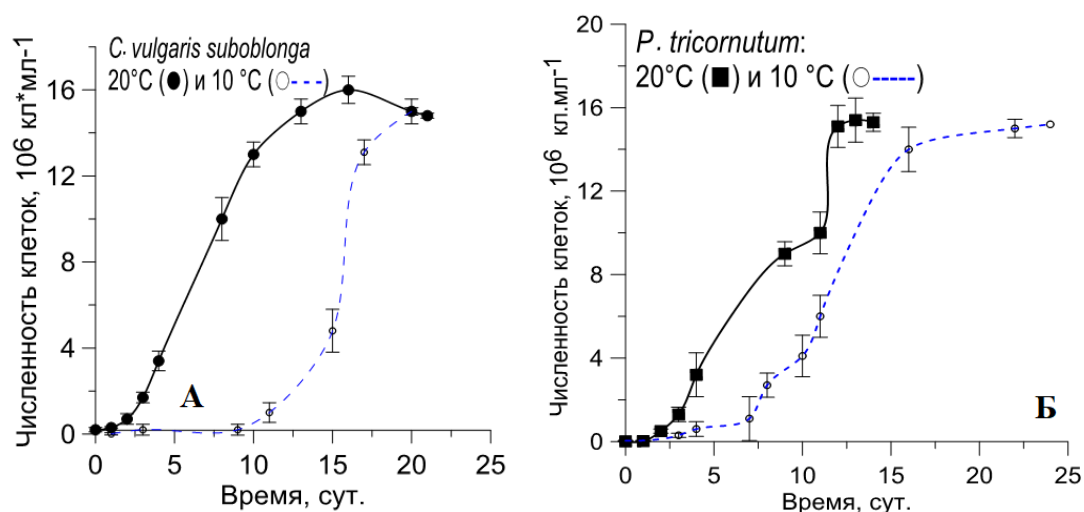


Рисунок 5.7 – Динамика численности в культуре *Chlorella vulgaris suboblonga* (А) *Phaeodactylum tricornutum* (Б)

Среднее значение объёма клеток водоросли *P. tricornutum*, адаптированной к низкой температуре, было в 2 раза выше, чем при температуре 20 °С, что, возможно, также объясняется задержкой клеточного деления, как и в ранее описанных случаях (таблица 5.3).

Изменение флуоресценции хлорофилла *a* (FL4) при низкой температуре было незначительное для исследуемых видов, тогда как при 20 °С наблюдали падение показателя практически в два раза (рисунки 5.8, 5.9).

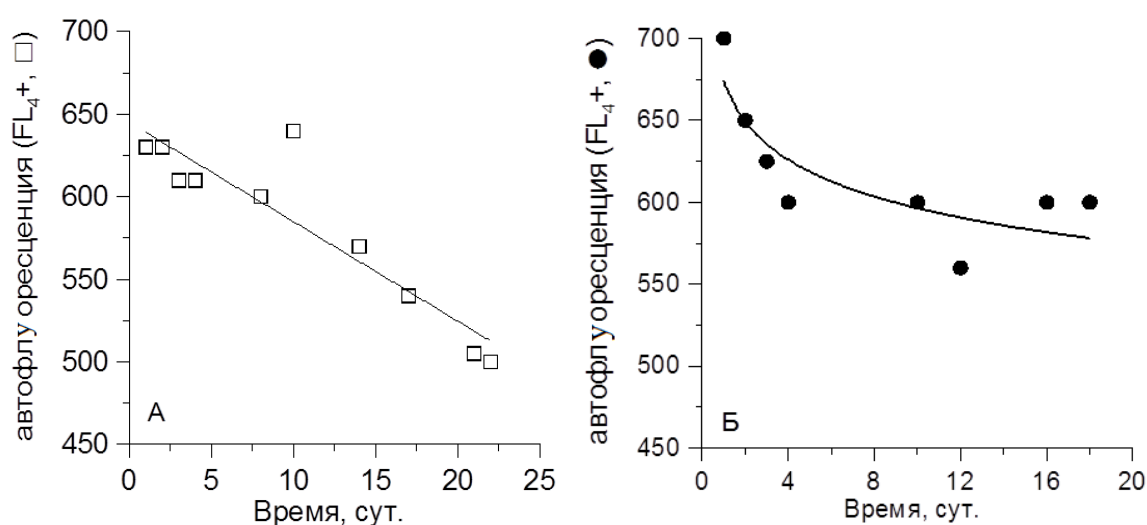


Рисунок 5.8 – Изменение автофлуоресценции FL4 клеток *C. vulgaris suboblonga* при температуре 20 °С (А) и 10 °С (Б)

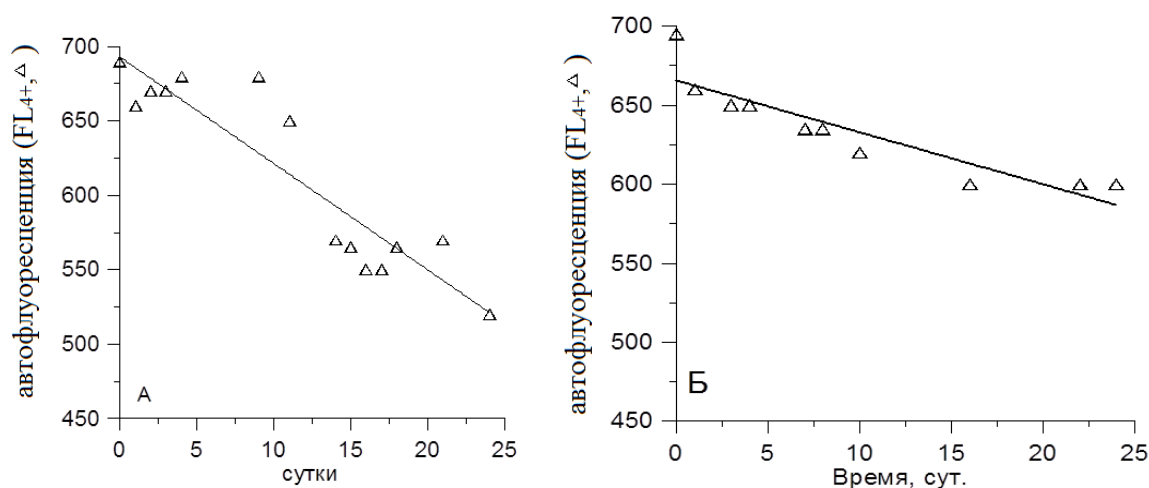


Рисунок 5.9 – Изменение автофлуоресценции FL4 клеток *P. tricornutum* при температуре 20 °C (А) и 10 °C (Б)

На рисунке 5.10 приведены цитогаммы *C. vulgaris suboblonga* в стационарной фазе роста при акклимации к 10 и 20 °C (численность клеток в пробах была одинаковая $16 \cdot 10^6$ кл.·мл⁻¹). Высокая изменчивость объёмов клеток при низкой температуре и в начале стационарной фазы роста исследуемых видов водорослей свидетельствует об изменении морфологии клеток водорослей и перестройках в метаболических процессах, вызванных низкой температурой и, возможно, высокой плотностью.

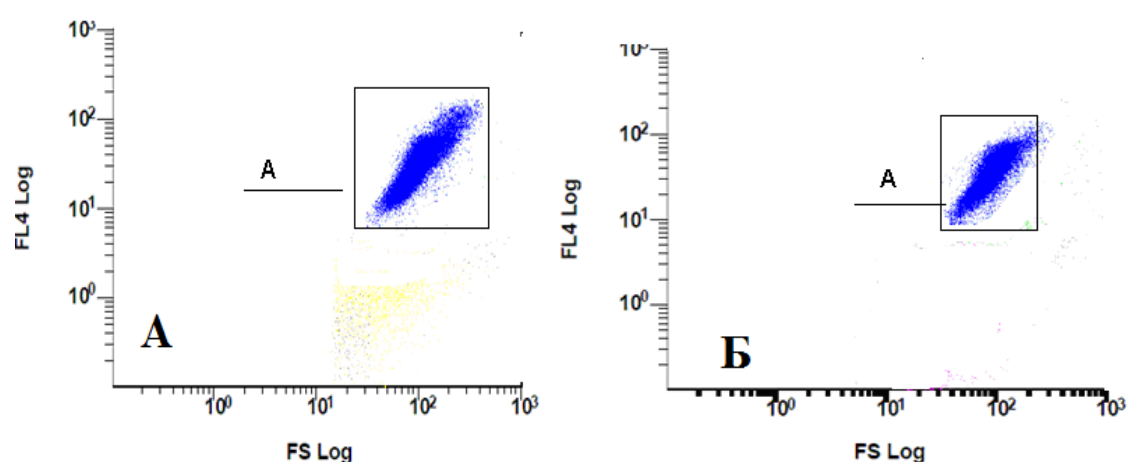


Рисунок 5.10 – Цитогаммы распределения культуры *C. vulgaris suboblonga* в координатах FSLOG (прямое рассеяние) FL4LOG (автофлуоресценция) при низкой (А) и высокой (Б) температурах

Таблица 5.3 Изменение объёмов клеток водорослей в зависимости от температуры

Вид - <i>Chlorella vulgaris suboblonga</i>							
Сут.	T, °C	V, мкм ³ ±SD	CV, %	Сут.	T, °C	V, мкм ³ ±SD	CV, %
1	20	45±9	20	1	10	40±14	35
2		47±9	19	2		86±28	34
3		45±9	20	3		88±20	33
4		42±9	22	4		90±20	35
8		45±16	35	8		40±10	35
10		42±17	40	10		45±21	42
14		35±14	40	14		45±19	47
17		32±11	33	17		45±19	42
Вид - <i>Phaeodactylum tricornutum</i>							
0	20	55±13	23	0	10	94±26	28
1		35±11	30	1		117±26	32
2		35±11	30	3		97±23	34
3		25±8	31	4		65±14	32
4		33±11	31	7		84±25	39
9		46±16	34	8		82±27	40
11		50±20	40	10		81±28	42
12		31±10	41	11		89±40	42
13		30±9	45	16		90±41	45
14		29±11	45	22		90±29	32
15		58±20	44	24		85±28	33

В работе [74] показано, что объем клеток протистов (44 вида) (биомасса и сухой вес) уменьшается с увеличением температуры, что согласуется с нашими данными. В исследовании [187] объем клеток *Nannochloropsis sp.* и двух штаммов *Isochrysis galbana* также уменьшался с увеличением температуры, однако у двух

других штаммов *Isochrysis galbana* не наблюдалось достоверной зависимости между объемами клеток водорослей и температурой. Отсутствие зависимости между температурой и изменениями объемов клеток *Coscinodiscus* sp., *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros simplex* var. *calcitrans*, *Isochrysis galbana* апоказано в работе [160], в то время как, для *Cyclotella cryptica*, *Ditylum brightwellii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira eccentrica*, *Thalassiosira weissflogii* авторами, наоборот, отмечено уменьшение объемов клеток водорослей с ростом температуры.

У *Isochrysis galbana*, *Pleurochrysis carterae*, *Chaetoceros gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Thalassiosira weissflogii*, *Coscinodiscus* sp. отмечен рост средних размеров клеток с возрастанием интенсивности света от 190 до 750 мЭм⁻²с⁻¹, при увеличении освещенности с 25 до 90 мЭм⁻²с⁻¹ для тех же видов водорослей наблюдалось уменьшение их клеточных объемов [110]. Объем клеток *Phaeodactylum tricornutum* уменьшался почти в три раза в ответ на снижение уровня облученности от 400 до 30 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ [108]. В работе [94] показано уменьшение объема клеток *Hymenomonas elongata* на 25% при росте водорослей на низкой интенсивности света, в то время как, для *Isochrysis galbana* не наблюдалось изменение объемов клеток в зависимости от интенсивности света. В связи с чем, можно предположить, что изменение объемов клеток водорослей не является показателем, указывающим на потерю культур микроводорослей их жизнеспособности, не может характеризовать изменения их физиологического состояния.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что для оценки состояния водорослей целесообразней использовать коэффициент варибельности их клеточных размеров. Для всех исследуемых видов показано возрастание CV при неблагоприятных условиях выращивания (низкая температура, высокая освещенность, наступление стационарной фазы роста). Стрессовые условия окружающей среды приводят к деструктивным изменениям в мембранах хлоропласта – слипанию фотосинтетических мембран, увеличению интрамембранного пространства, а также к разбуханию пластид,

прогрессирующей вакуолизации, результатом чего является деплазмолиз и изменение формы клеток [40, 81].

В литературе крайне мало работ, где по вариабельности размерного спектра клеток оценивали физиологическое состояние водорослей. Подобный подход продемонстрирован в работе [101], для *Emiliana huxleyi* и *Thalassiosira pseudonana* получена высокая дисперсия по значениям FS (боковое светорассеяние) и SS (прямое светорассеяние) при переходе культур в стационарную фазу роста. Увеличение CV параметра FS в два раза трактовалось автором, как отклик *Phaeodactylum tricornutum* на высокое содержание меди в среде и свидетельствовало о резком снижении жизнеспособности культуры [104]. Марушкиной Е.В. также отмечено, что при влиянии хлорида меди на размер клеток *Scenedesmus quadricauda* их средняя ширина оставалась примерно на том же уровне. Было установлено, что медь оказывает влияние на характер распределения. Если на первые сутки во всех концентрациях и контроле дисперсия ширины составляла 1-1,8 при средней ширине клеток 4,8-5 мкм, то в конце опыта ее значение снижалось до 0,1-1,6 при низких концентрациях меди и значительно увеличивалось по сравнению с контролем при высоких [29]. Для *D. viridis* выявлена достаточно высокая вариабельность форм клеток при адаптации культуры к среде с повышенным содержанием меди, что являлось отражением изменения функционального состояния клеток в процессе развития водоросли [22]. После 96 – часового действия параквата на клетки *Chlamydomonas eugametos* сигнал FS стал более разнородным, тем самым, указывая на гибель культуры, о чем свидетельствовало и сильное падение значений флуоресценции хлорофилла *a* [104].

В работе [25] показано, что неоднородность объемов клеток *A. ussurensis* вызвана двойным стрессом: изменением солёности и присутствием конкурента. Также автором отмечено, что при всех солёностях и в моно-, и в смешанных культурах CV_{max} наблюдался в начале стационарной фазы роста.

Появление в культуре *Euglena gracilis* мутированных клеток при стрессовых условиях культивирования привело к увеличению гетерогенности популяции [210]. При неблагоприятных условиях среды *Chlamydomonas reinhardtii* образует

многоклеточные агрегаты известные, как «пальмеллоиды», результатом чего явилась высокая неоднородность культуры по структурным и функциональным показателям [137].

Таким образом, Отмечено, что изменение объёмов клеток водорослей не является существенным показателем, указывающим на деградацию культур или потерю их жизнеспособности. Коэффициент вариации объемов клеток представляет собой более чувствительный параметр при рассмотрении гибели культуры и может лежать в основе косвенного критерия, используемого для оценки физиологического состояния водорослей. Высокие значения гетерогенности объемов клеток культур получены в стационарной фазе роста, при освещённости $206 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, и при температуре 10°C , что свидетельствует о переходе водорослей из состояния гомеостаза в стрессовое состояние и о возрастании количества мертвых и неактивных клеток. Данный подход в сочетании с проточной цитометрией является быстрым и простым, а также позволяет анализировать состояние микроводорослей без окрашивания флуоресцентными красителями.

ГЛАВА 6 СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПИКО- И НАНОФИТОПЛАНКТОНА В ПРИБРЕЖНЫХ ВОДАХ ЧЕРНОГО МОРЯ

Результаты исследований с тестовыми видами микроводорослей, представленные в предыдущих разделах, показали, что при потере водорослями своей жизнеспособности, клетки в большей степени не отмирают, возрастает доля малоактивных клеток, процент мёртвых клеток не велик и зависит от морфологических особенностей вида и степени воздействия факторов среды. Обоснованный на монокультурах одноклеточных водорослей подход использования количества жизнеспособных клеток и параметр FDA_f в качестве индикаторов функционального состояния водорослей апробировали на природном фитопланктоне, в частности для оценки физиологического состояния пико- и нанофракций в прибрежных водах Черного моря с помощью проточной цитометрии с учётом того, что ранее в Черном море такие исследования не проводились.

Для этих целей были использованы методы проточной цитофлуорометрии, позволяющие работать с нативными пробами. Окраску пико – и нанофитопланктона флуорохромом FDA производили в соответствии с протоколом, описанным ранее для культур *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3 [49].

На рисунке 6.1 представлены типичные цитограммы неокрашенных (рисунок 6.1А) и окрашенных FDA проб воды (рисунок 6.1Б), где кластеры точек С и Е соответствуют исследуемым размерным группам пико – и нанофитопланктона до окраски флуоресцеином диацетата, кластеры D, F соответственно после окраски FDA.

Диапазон колебания значений FL1LOG (ось ординат, рисунок. 6.1Б) достаточно велик, что говорит о неоднородности клеток исследуемых групп по интенсивности флуоресценции FDA, тем самым, свидетельствуя о наличие

клеток с различным функциональным состоянием в рамках одной размерной группы.

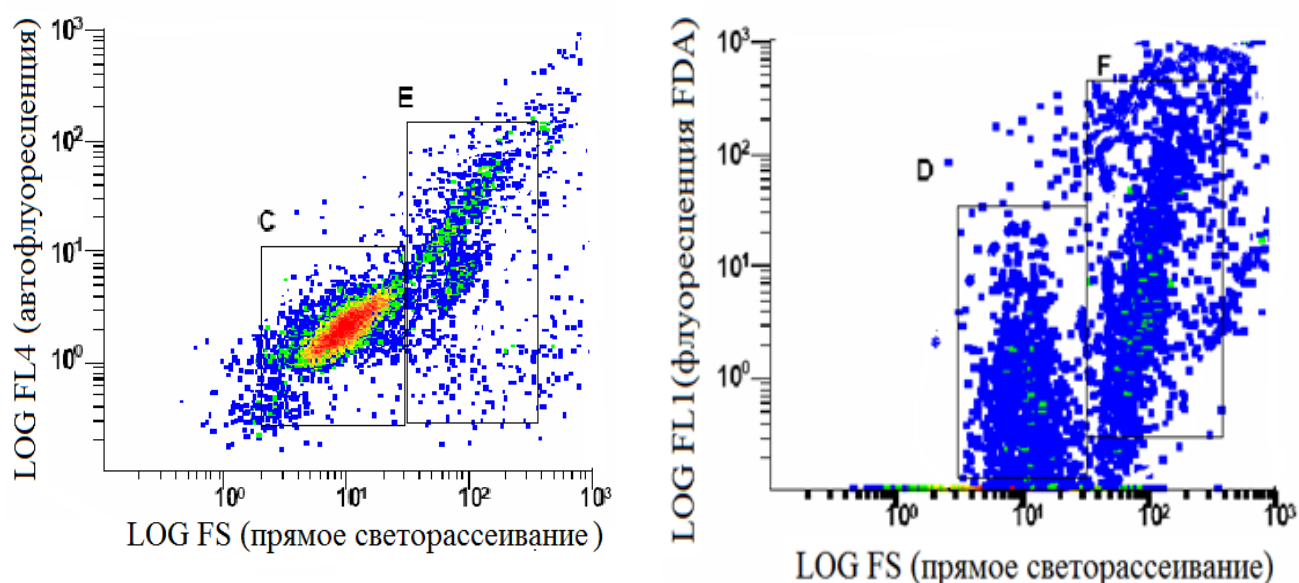


Рисунок 6.1 – Типичные цитогаммы неокрашенных (слева) и окрашенных FDA проб фитопланктонного сообщества (справа) (С – пикофракция, Е – нанофракция) (D и F клетки пико- и нано фитопланктона окрашенные FDA)

Минимальные значения концентрации хлорофилла *a* и суммарной биомассы пико и нанофитопланктона наблюдались в исследуемой акватории (схема станции изображена на рисунке 2.4) в зимний и ранневесенний периоды – $0,5-0,7 \text{ мгм}^{-3}$ и $100-200 \text{ мгС м}^{-3}$ соответственно. Синхронное повышение этих параметров происходило в течение весеннего периода до июня при температурах $9-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (примерно в 2,5 раза). Максимальные величины биомассы фитопланктона наблюдались в июне (450 мгС м^{-3}) (рисунок 6.2А). По мере дальнейшего прогрева воды и увеличении инсоляции в июле содержание хлорофилла *a* водорослей снижалось в среднем в 1,4 раза по сравнению с июньским и сохранялось в пределах $0,9-1,5 \text{ мг м}^{-3}$. При понижении температуры в октябре и ноябре и разрушении стратификации содержание хлорофилла *a* повышалось до $1,5-1,7 \text{ мг м}^{-3}$, при этом рост биомассы водорослей был незначительным и в среднем она составила 220 мгС м^{-3} . Следует отметить, что биомасса водорослей определялась

на проточном цитометре, а концентрация хлорофилла *a* стандартным спектрофотометрическим методом [135], где учитывались клетки размером свыше 35 мкм. Возможно, этим и объясняются полученные более высокие значения хлорофилла *a* по сравнению с биомассой в осенний период, когда по данным [58] доминировали крупные размерные фракции и нитчатые колонии диатомовых водорослей.

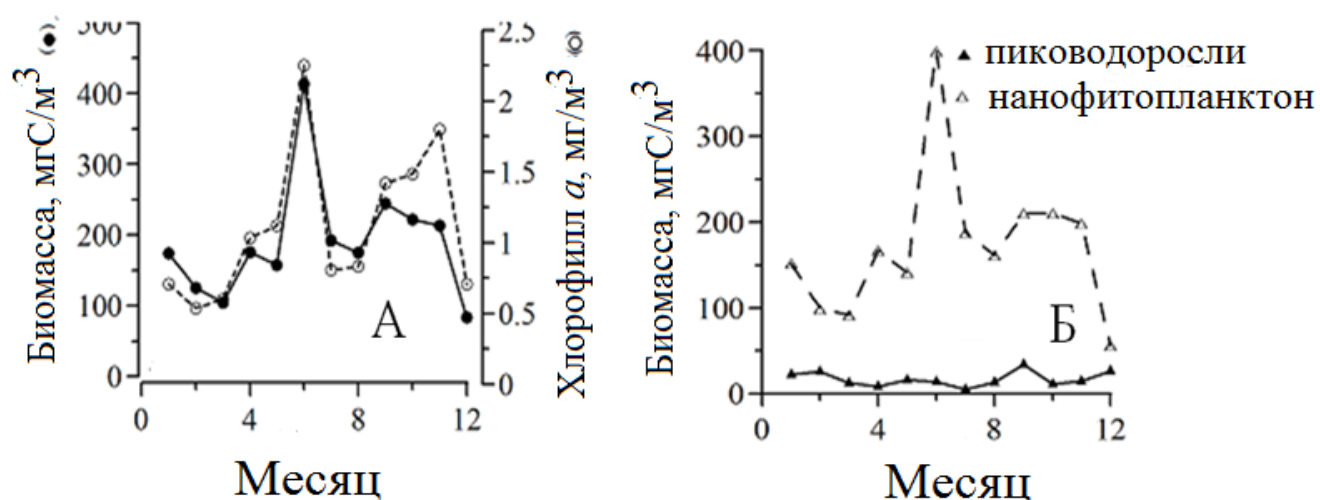


Рисунок 6.2 – Сезонные изменения концентрации хлорофилла *a* и биомассы водорослей (А), биомассы выделенных групп водорослей (Б)

Между величинами суммарной автофлуоресценцией клеток водорослей (канал FL4, 675 нм), определяемой на проточном цитофлуориметре и содержанием хлорофилла *a* наблюдалась линейная корреляция ($R^2=0,81$). Между биомассой исследуемых групп водорослей и содержанием хлорофилла *a* также получена линейная корреляция, с коэффициентом детерминации $R^2=0,8$ (рисунок 6.3). Биомасса пикофитопланктона (*Synechococcus* и эукариотический пикофитопланктон) практически не изменялась в течение годового цикла и составила в среднем 18 ± 9 мгС м⁻³ (рисунок 6.2Б). На протяжении всего периода исследования данная группа водорослей вносила минимальный вклад в суммарную биомассу пико- и нанофитопланктона: от 8 % в теплый период года (температура воды $>15^\circ$ C) до 26 % в холодный период года (температуры воды

<15° C). Основной вклад в биомассу составлял нанофитопланктон, обилие которого имело тенденцию повышения от зимы к лету (рисунок 6.2Б). Второй пик биомассы нанофитопланктона отмечен в осенний период.

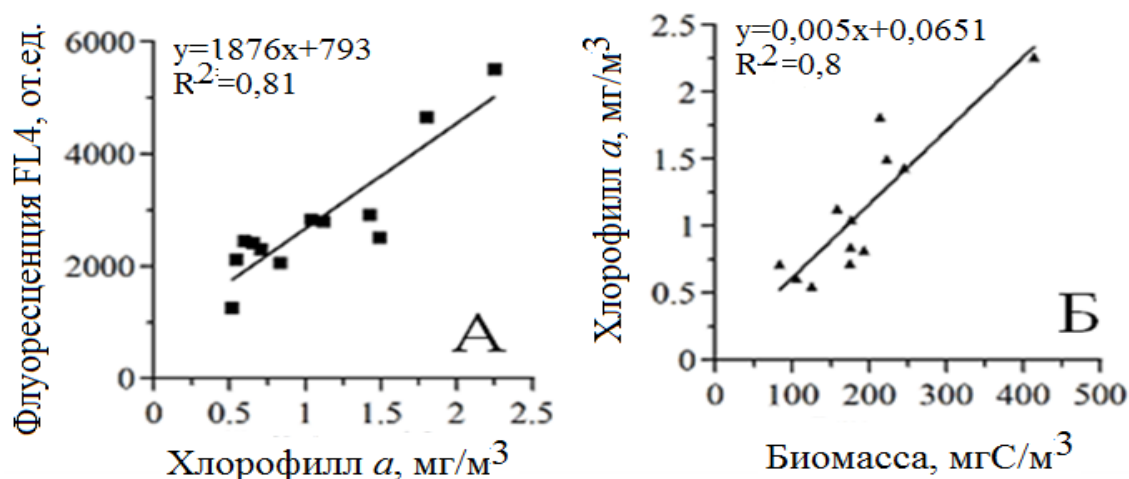


Рисунок 6.3 – Взаимосвязь хлорофилла *a* и автофлуоресценции клеток водорослей (А), хлорофилла *a* и биомассы (Б)

В таблице 6.1 представлены коэффициенты корреляции, рассчитанные между абиотическими факторами среды и биомассой исследуемых групп водорослей. Интерпретация полученных коэффициентов должна проводиться с учетом возможных причинно-следственных связей между сравниваемыми величинами. Так, низкая корреляция обилия пико - и нанофитопланктона с температурой воды и содержанием нитратов в водной толще может быть следствием слабо выраженной сезонности этих параметров или значительными различиями в их сезонной динамике. Значимая обратная корреляция между биомассой пикозукариотических водорослей и облученностью отражает закономерность того, что в теплый период года избыточная инсоляция приводит к снижению биомассы пикозукариотических водорослей.

Также получены значимые положительные величины R^2 между биомассой нанофитопланктона и содержанием фосфора в морской среде. Однако более достоверная интерпретация согласованности этих величин может быть выполнена с учетом совместного действия абиотических факторов путем расчета частных

коэффициентов корреляций или применения одного из методов многомерного статистического анализа (например, канонический корреляционный анализ).

Таблица 6.1 Коэффициенты парной корреляции между исследуемыми переменными*

Биомасса, мгС/м ³	I, Э/м ² ·день	T, °C	NO ₃	NH ₄	PO ₄	Si	Числ., 10 ³ кл/мл
<i>Synechococcus</i>	-0,16	0,37	-0,25	0,06	0,25	<u>0,67</u>	<u>0,97</u>
пикозукариотические водоросли	<u>-0,75</u>	-0,53	0,18	0,03	-0,47	0,35	<u>0,98</u>
нанопланктон.	0,46	0,53	-0,28	-0,4	<u>0,63</u>	0,11	<u>0,87</u>

*Подчеркнуты статистически значимые ($p < 0,05$) показатели.

В период исследований в прибрежных водах, доля жизнеспособных клеток пико и нанопланктона изменялась от 70 до 100 %, составляя в среднем 80 %, что указывает на отсутствие сезонной её вариабельности, что показано на рисунке 6.4. Следует отметить, что FDA окрашивает не только живые, активные клетки, но и малоактивные, находящиеся в покоящейся стадии, с неразрушенной цитоплазматической мембраной. Флуоресценция таких клеток значительно слабее по сравнению с живыми активными клетками.

Поэтому для исследуемых групп водорослей мы используем параметр величина средней флуоресценции FDA на клетку. Исходя из данных, представленных на рисунке 6.5 в зимне-весенний период величина флуоресценции FDA для пикофитопланктона (*Synechococcus* и пикозукариотические водоросли) имела низкие значения, для нанопланктона данный параметр сохранял высокие значения при низкой температуре. По мере прогрева воды в середине мая значение показателя флуоресценции FDA увеличивалось в среднем в 2-3 раза для пикофитопланктона и практически не изменялось вплоть до октября месяца. При понижении температуры в осенне-

зимний период величина флуоресценции FDA значительно снижалась у пиководорослей. Для нанофитопланктона получена обратная зависимость флуоресценции FDA от температуры (рисунок 6.6). Однако полученные высокие проценты живых клеток для всех групп водорослей в исследуемый период говорят о сохранении жизнеспособности водорослей, несмотря на снижение активности внутриклеточной эстеразы в клетках.

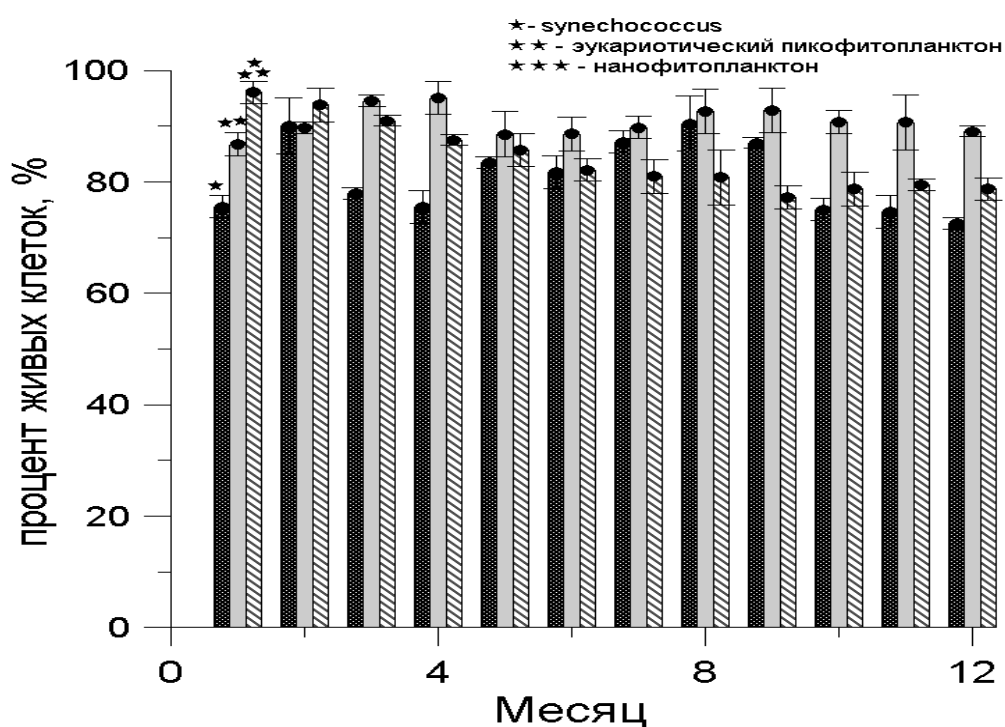


Рисунок 6.4 – Сезонная динамика доли живых клеток исследуемых групп водорослей

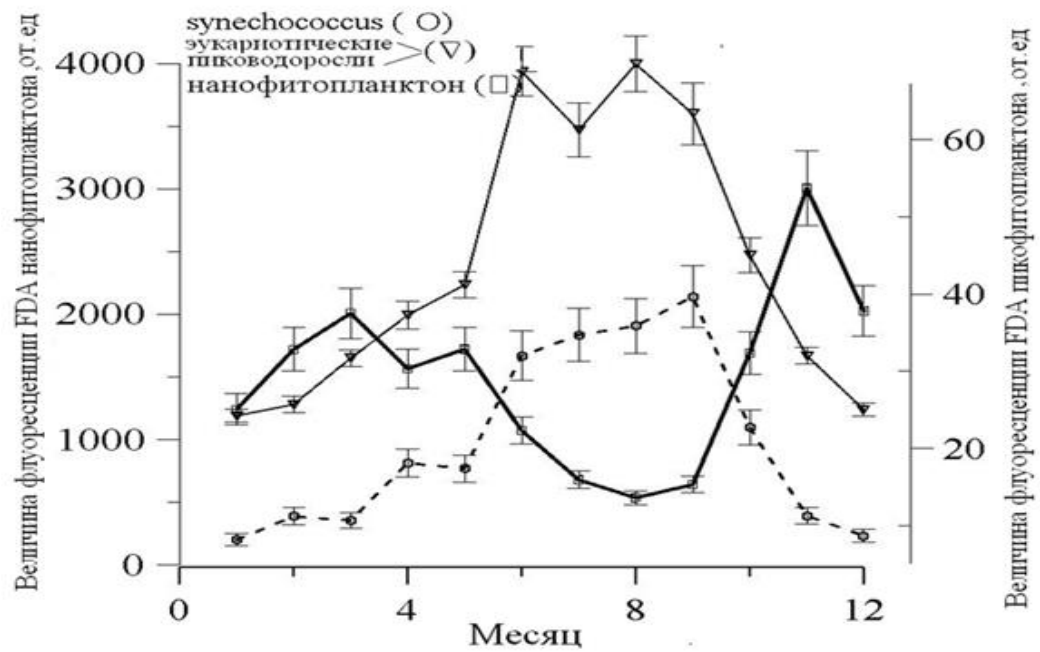


Рисунок 6.5 – Сезонный ход величины флуоресценции FDA выделенных групп фитопланктона

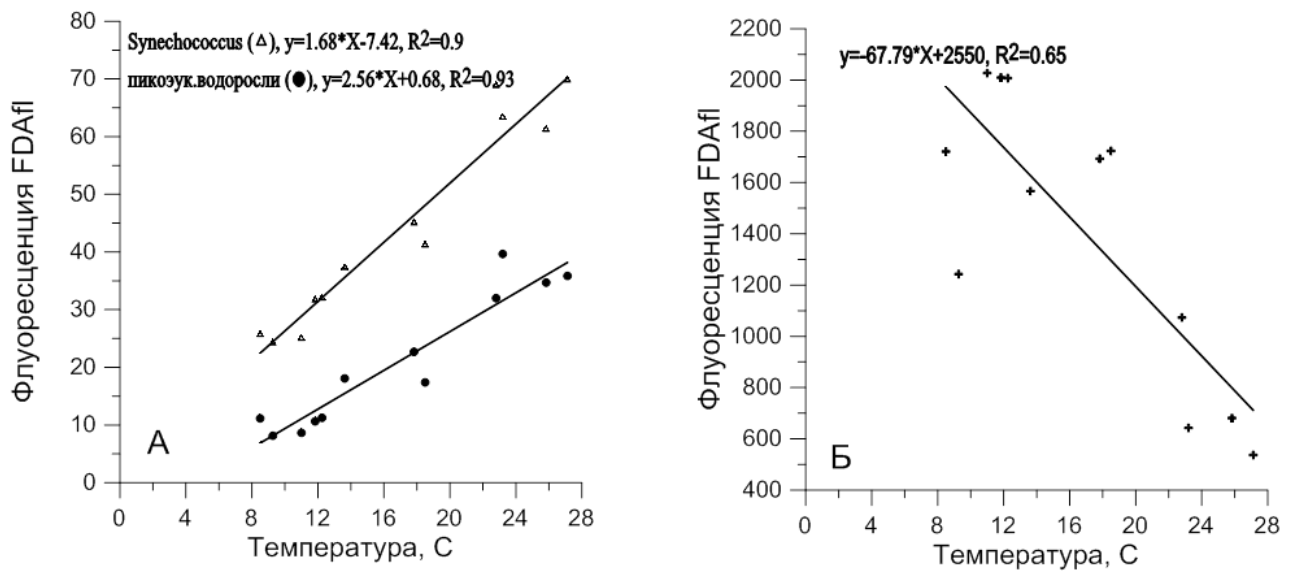


Рисунок 6.6 – Связь между величиной флуоресценции FDA и температурой воды для пикофитопланктона (А) и для нанофитопланктона (Б)

Другие абиотические факторы среды не оказывали существенного влияния на величину флуоресценции FDA.

Полученные в данном разделе результаты позволили подтвердить гипотезу, выдвинутую в более ранних исследованиях, об отсутствии существенного вклада крупных клеток водорослей в суммарный хлорофилл прибрежной зоны Черного моря. Так был сделан анализ сезонных размерных спектров фитопланктона по измерениям хлорофилла *a* в Черном море в Севастопольской бухте и показано доминирование мелкоразмерного фитопланктона (клетки от 0,2 до 10 мкм) на большей части периода исследования [36]. Автором была отмечена общая тенденция повышения роли мелких клеток в структуре фитопланктона бухты, которая была особенно наглядна при рассмотрении величин совокупных относительных вкладов пико- и нанофитопланктона, составлявших от 64 до 75 % в суммарной концентрации хлорофилла *a* в зависимости от района и до 70 % для бухты в целом. Это, возможно, и объясняет достоверно положительная корреляция между величинами биомассы, измеренными на проточном цитометре и концентрацией хлорофилла *a* определенной спектрофотометрическим методом.

Диапазоны изменения количественных показателей пикофитопланктона, полученные нами для прибрежных черноморских вод, в целом, соответствовали ранее опубликованным данным для Черного моря [33, 36, 51]. Так Л. В. Стельмах [51] показано, что на долю пикофитопланктона в Севастопольской бухте приходилось от 18 % до 44 % первичной продукции и от 20 % до 40 % хлорофилла *a* в течение года. Характер сезонных изменений биомассы нанофитопланктона, основу которой, по данным [58] составляла кокколитофорида *Emiliania huxleyi* и мелкие диатомовые виды (*Skeletonema costatum*, водоросли рода *Chaetoceros*) соответствует сложившимся ранее представлениям о продуктивности шельфовой части Черного моря [50, 56].

В литературе не раз отмечалось, что низкая температура и интенсивность света зимой обеспечивают преимущество для развития пикозукариотических водорослей, тогда как более высокие значения температуры и интенсивности света благоприятны для цианобактерий [173, 213]. В работе [191] автором

выдвинуты основные гипотезы, которые указывают на особенности цианобактерий, позволяющие им конкурировать с пикозукариотическими водорослями и вносить свой вклад в развитие фитоценоза: а) цианобактерии развиваются при высокой температуре воды в широком световом диапазоне б) наблюдаются вспышки развития цианобактерий в водах с низким содержанием биогенных элементов. Возможность *Synechococcus* расти в широком диапазоне интенсивностей света и при лимитировании водорослей биогенными элементами в воде, что формирует его развитие в летний и раннеосенний периоды, обеспечивается содержащемся в них пигменту - фикоэритрину, который они используют как внутренний источник азота [214] и при адаптации к различным световым условиям [120, 201].

Отмечено, что температура и содержание нитратов в водной толще не оказывали значительного влияния на обилие пикопланктона, что подтверждено в работе [213], в том числе и для исследуемого района [33]. Однако большинство авторов придерживаются теории, что температура является одним из основных факторов, который регулирует численность пиководорослей [62, 176]. Что касается нано- и микрофитопланктона, то в литературе не раз отмечалось, что температура не является главным фактором определяющим величину первичной продукции в Мировом океане [85]. Карты распределения продуктивности вод Мирового океана показывают, что величина первичной продукции связана в основном с гидрологическими процессами различного масштаба, вызывающими обогащение поверхностных вод питательными элементами [21, 85]. На сезонную динамику биомассы нанофитопланктона в толще воды оказывает влияние большой комплекс факторов. Из физических факторов следует отметить: интенсивность света, температуру и роль физических процессов в формировании химической структуры вод в исследуемом регионе. Основной вклад в биомассу нанофитопланктона Черного моря вносят мелкие виды диатомовых водорослей, флагелляты и кокколифориды *Emiliana huxleyi*. По данным [58] в период с апреля по август и в осенний период 2014 года в фитопланктонном сообществе массово развивалась кокколитофориды *Emiliana huxleyi* (клетки диаметром 6-11 мкм).

Именно в этот период года нами получены максимумы биомассы нанофитопланктона. «Цветение воды» в результате всплеск развития *Emiliania huxleyi* в основном связано с вертикальной циркуляцией вод и поступлением в эвфотическую зону большого количества минерального фосфора. [32] в своих исследованиях показали, что наиболее значимым фактором массового развития *E. huxleyi* в Черном море является концентрация фосфатов в среде, что подтверждается полученной нами статистически значимой корреляцией между биомассой нанофитопланктона и концентрацией неорганического фосфора.

Дифференцирующим критерием для распознавания живых и мёртвых клеток могут служить любые признаки живого, такие как способность клеток к делению и образованию колоний, подвижность, проявления метаболической активности, ферментативные реакции, состояние барьера проницаемости, накопление АТФ, морфологические признаки и т.д. В исследованиях культур микроводорослей и природного фитопланктона для маркирования живых клеток широко применяется диацетат флуоресцеина (FDA) [96, 118]. В исследуемой акватории (рисунок 2.4) процент живых клеток пико и нанофитопланктона не проявлял сезонной вариабельности и в течение года в среднем составил 80 %. Однако следует учитывать, что диацетат флуоресцеина окрашивает не только живые, активные клетки, но и живые - малоактивные, находящиеся в покоящейся стадии. [193] в своих исследованиях показали, что наряду с живыми, активными клетками в течение года в фитопланктонном сообществе присутствуют «бездействующие» неактивные клетки, которые не имеют морфологических модификаций и остаются жизнеспособными - «физиологически покоящиеся клетки». [147] также отмечено, что зимой, несмотря на низкие значения температуры воды, у бентосных цианобактерий наблюдался низкий уровень эстеразной активности, которая, по мнению авторов, была эквивалентна состоянию покоя водорослей. Такое состояние покоя присуще многим видам водорослей из разных таксономических групп [158, 211]. В связи с этим, в исследовании функционального состояния природных сообществ микроводорослей целесообразно использование средней флуоресценции FDA на

клетку. В проводимом нами исследовании показано, что величина флуоресценции FDA на клетку имела достоверную положительную корреляцию с температурой воды в Черном море для пикофитопланктона и отрицательную взаимосвязь для нанофитопланктона. Другие факторы среды не оказывали существенного влияния на сезонную динамику величины флуоресценции FDA. Максимальные значения флуоресценции FDA пикофитопланктона в летний период могут быть связаны с предположением, выдвинутым [61], что в летние месяцы скорость деления клеток данной размерной группы значительно выше, чем в остальной период года, результатом чего может быть полученная максимальная биомасса (35 мгС/м^3) в сентябре месяце. В холодный период года при повышенных концентрациях биогенных элементов в прибрежных водах Черного моря более активен нанофитопланктон, основными представителями которого выступают мелкие диатомовые водоросли, в частности *S. costatum* и водоросли рода *Chaetoceros*, а также кокколитофорида *Emiliana huxleyi* [50], что подтверждают и наши результаты, показывающие высокие значения эстеразной активности в клетках нанофитопланктона.

Таким образом, результаты, представленные в этом разделе, позволяют сделать ряд обобщений.

Предложенный критерий оценки функционального состояния водорослей с помощью флуоресцентного красителя FDA и проточной цитометрии может применяться как для культур водорослей, так и на природных сообществах фитопланктона.

Сезонная динамика биомассы пико- и нанофитопланктона и хлорофилла *a* характеризовалась высокими осенними показателями и июньским максимумом. Вклад пикофитопланктона (*Synechococcus* и эукариотические пиководоросли) в суммарную биомассу в среднем составил 20 %.

Получена статистически значимая корреляция между содержанием хлорофилла *a*, определяемым стандартным спектрофотометрическим методом, и

суммарной автофлуоресценцией хлорофилла *a* и биомассой, определяемыми на проточном цитометре.

Показано, что процент живых клеток не проявлял сезонной вариабельности и в течение года в среднем составил 80 %. Величина флуоресценции FDA на клетку имела достоверную положительную корреляцию с температурой воды в Черном море для *Synechococcus* и пикозукариотических водорослей и отрицательную взаимосвязь для нанофитопланктона, что еще раз подтверждает тот факт, что холодный период года характеризуется активностью и развитием нанофитопланктона, тогда как в теплый период года пиководоросли способны конкурировать и давать вспышки развития в фитоценозе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа была проведена с целью усовершенствования и отработки методов экспресс-контроля физиологического состояния водорослей в разных условиях роста в культурах и прибрежных водах Чёрного моря и поиска новых, более консервативных маркеров, позволяющих характеризовать состояние морских биоценозов, что может быть важно для прогностических целей и построения экологических моделей.

Нами, в качестве таких методов экспресс-контроля применены: метод проточной цитометрии в комбинации с флуорохромом диацетатом флуоресцеина (FDA) [136], а также метод исследования флуоресцентных параметров водорослей, характеризующий эффективность переноса и утилизацию энергии в первичных фотохимических процессах (F_v/F_m) [171, 177]. Комбинирование данных методов позволило оценить физиологическое состояние микроводорослей, как в культурах при различных условиях выращивания, так и в прибрежном районе Черного моря с использованием более оперативных индикаторов, таких как:

- соотношение живых и мёртвых клеток;
- величина флуоресценции FDA;
- максимальная квантовая эффективность фотосинтеза;
- вариабельность размерного спектра клеток.

Данные маркеры физиологического состояния водорослей можно представить, как количественные и качественные показатели, отражающие адаптационные, компенсаторные возможности и летальные воздействия на клетки микроводорослей, так и косвенные, которые лишь указывают на снижение жизнеспособности в результате «старения» клеток или их отклик на действие меняющихся факторов окружающей среды (рисунок 1).



Рисунок 1 – Экспресс - индикаторы физиологического состояния микроводорослей

Коэффициент вариации клеточных размеров водорослей

Дисперсия клеточных размеров водорослей представляет собой косвенное определение физиологического состояния водорослей, но может являться важным показателем адаптации клеток к изменению условий культивирования. Высокие значения CV клеток наблюдались у всех исследуемых видов водорослей в стационарной фазе роста, где происходит снижение концентрации питательных веществ в среде, которое приводит к лимитированию фотосинтеза и удельной скорости роста. В данном случае для более детального анализа состояния водорослей необходимо дополнительное исследование внутриклеточных

компонентов. Также основным недостатком данного маркера является невозможность его использования для оценки состояния водных альгоценозов.

Коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла (F_v/F_m)

Величина переменной флуоресценции – параметр, характеризующий эффективность переноса энергии света в первичных фотохимических процессах (максимальный квантовый выход разделения зарядов фотосистемы 2) [4]. Эта величина является чувствительным показателем функционального состояния водорослей [30, 31, 45, 71]. Кроме того флуоресцентные параметры используются для оценки фотосинтетической активности и продукции фитопланктона в природных условиях и культурах [25, 100, 116, 123].

У исследуемых видов водорослей показана устойчивость коэффициента переменной флуоресценции хлорофилла в широком диапазоне световых и температурных условий, и реактивность этого параметра под влиянием экстремальных значений этих факторов. При высоких уровнях освещенности и температуры (выше $1200 \text{ мкЭ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ фотосинтетически активной радиации и 27°C) относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a* значительно снижается, что сопряжено с ингибированием роста водорослей и фотоокислением хлорофилла. При изменении уровня азотного лимитирования F_v/F_m начинает отклик при 3-х, 4-х кратном торможении роста, что связано со снижением внутриклеточных пулов азота и хлорофилла. В условиях накопительного роста культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* отмечена положительная корреляция ($R^2=0,9$) между величиной F_v/F_m и удельной скоростью роста (μ) водорослей. Наблюдалась высокая скорость восстановления (менее суток) данного показателя при улучшении условий культивирования. В этом отношении коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* может служить параметром контроля использования лимитирующего фактора в управляемом процессе.

В связи с тем, что в данной работе коэффициент относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* использовался как индикатор состояния водорослей

в условиях культур, мы высказываем предположение о применимости данного маркера для оценки функционального состояния природных сообществ. В целом имеющиеся литературные данные можно разделить условно на два типа: параметр Fv/Fm неэффективен в исследованиях природных сообществ фитопланктона в виду его видоспецифичности, коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла зависит от таксономической принадлежности водорослей [144, 216] и исследования где, оценка состояния водных альгоценозов проведена с применением показателя Fv/Fm без учета видового состава фитопланктона [30, 31, 45, 53, 154, 155, 198]. В нашей работе [68] исследованы температурные зависимости скорости роста и величины относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* основных представителей планктонных водорослей Черного моря и показано, что значения Fv/Fm в толерантной зоне для диатомовых водорослей выше, чем для динофитовых и были равны соответственно $0,68 \pm 0,04$ и $0,54 \pm 0,07$, поэтому, для применения данного индикатора необходим контроль видового состава черноморского фитопланктона.

Изменение активности внутриклеточных эстераз - величина флуоресценции FDA (FDA_{fl}).

Величина флуоресценции FDA более устойчивый параметр по сравнению с коэффициентом относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a*. Высокий уровень эстеразной активности в клетках сохраняется при значительном истощении внутриклеточных запасов азота, остановки роста и синтеза хлорофилла. Величины светового и температурного факторов начинают влиять на флуоресценцию FDA при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним эффект, что позволяет использовать метод флуоресценции FDA как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях культивирования. Восстановление этого параметра зависит от скорости регенерации нового клеточного материала лишь в том случае, когда значения данного показателя не снижаются до минимальных. Применение удельной флуоресценции FDA, как показателя метаболической активности водорослей,

практически не отражено в исследованиях морских фитоценозов, встречаются лишь единичные работы [147, 174], для оценки физиологического состояния фитопланктона Черного моря такие результаты получены впервые. Нами отмечено, что данный маркер может применяться для фитопланктонных сообществ без видовой дифференциации. Проведенные исследования показали, что в течение годового цикла интенсивность света и содержание питательных веществ в морской среде не оказывали существенного влияния на величину флуоресценции FDA у трех выделенных размерных фракций фитопланктона (*Synechococcus*, эукариотические пиководоросли, нанофитопланктон). Значения параметра FDA_f имели достоверную положительную корреляцию с температурой воды в Черном море для пикофитопланктона и отрицательную взаимосвязь для нанофитопланктона, т.е. в теплый период года в черноморском биоценозе наиболее активен пикофитопланктон, в то время как, холодный период года благоприятен для развития нанофитопланктона.

Соотношение живых и мёртвых клеток водорослей

По мере роста культур и перехода их в стационарную фазу доля покоящихся (неактивных) и мёртвых клеток в них возрастает. У *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3 в экспоненциальной фазе роста доля мёртвых и неактивных клеток не превышала 10 % в обеих культурах, тогда как в стационарной фазе она возросла почти до 100 % у *Nitzschia* sp. № 3 и 70 % – у *P. tricornutum*. При этом процент именно мёртвых клеток при благоприятных условиях роста в экспоненциальной фазе составляет 1-2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных цитоплазматической мембраной. В стационарной фазе роста, а также при высоких интенсивностях света и низкой температуре доля мёртвых и разрушенных клеток возрастает до 20-40 % для видов, имеющих клеточную оболочку и существенно меньше для видов без неё. Доля малоактивных клеток, с пониженной ферментативной активностью, в разные моменты роста культур составляет от 40 % до 80 %.

Главным образом малоактивные клетки служат для сохранения популяции в неблагоприятных условиях, при наступлении же благоприятных условий среды они способны перейти к размножению. При улучшении условий культивирования у исследуемых видов водорослей наблюдали рост параметров F_v/F_m и FDA_f и восстановление функционального состояния культур, при условии, что уровень фактора не приводил к летальному воздействию. Таким образом, возможно, жизнестойкость модельных культур в меняющихся условиях среды обеспечивалась количеством малоактивных клеток. Такой подход в оценке функционального состояния микроводорослей позволяет разделить клетки в рамках одной популяции (культуры) на группы относительно их физиологического состояния: от живых, метаболически активных до мёртвых, которые в основном представлены клеточными фрагментами (рисунок 2).

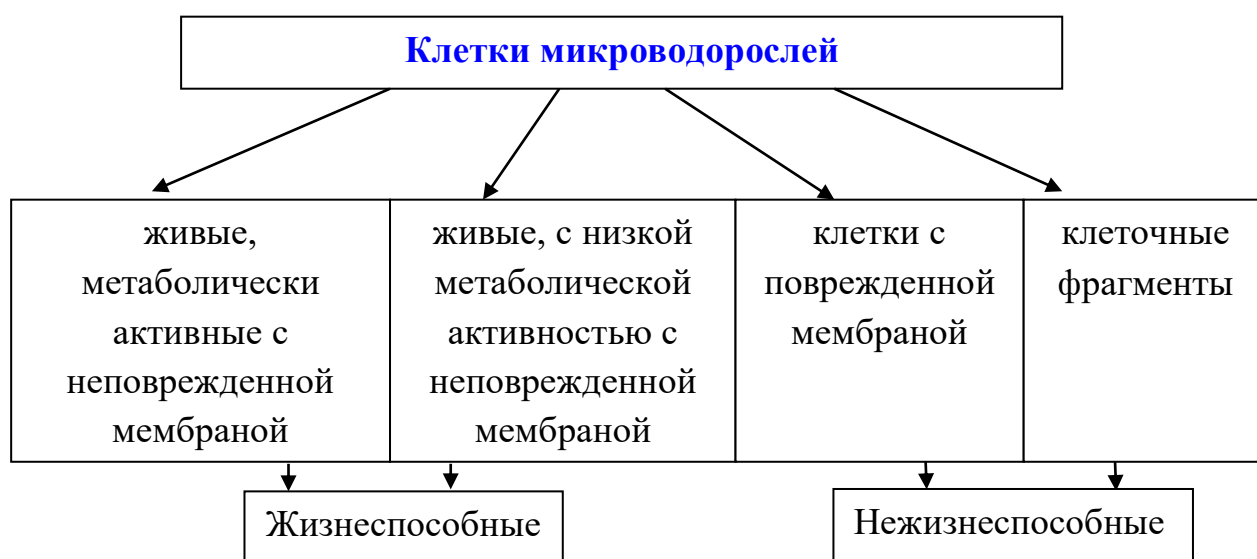


Рисунок 2 – Группы клеток внутри популяции микроорганизмов по гетерогенности функционального состояния

"Жизнеспособными" идентифицируются клетки водорослей, которые обладают способностью функционировать, т.е. фотосинтезировать, делиться, а главным образом восстанавливаться после потери функциональной активности. Как "нежизнеспособные" представлены клетки или водоросли, которые потеряли способность функционировать и эта потеря необратима. Ранее

проводились исследования, где по количеству жизнеспособных клеток оценивалось функционирование фитопланктонных сообществ [61, 63, 69, 206], однако такой индикатор для анализа физиологического состояния альгоценоза Черного моря применен впервые, за исключением работ [46, 43]. Однако в отличие от ранее выполненных исследований в настоящей работе подсчет количества жизнеспособных клеток сделан с применением современных методов измерений, в частности проточной цитометрии в комбинации с витальным красителем FDA, что позволило дать количественную оценку состоянию выделенных размерных фракций фитопланктона, а не отдельным видам водорослей. Показатель количества жизнеспособных клеток не проявлял сезонной вариабельности у пико- и нанофитопланктона и в среднем составил 80 %, что говорит об относительной стабильности физиологического состояния черноморского альгоценоза.

Настоящая работа расширяет имеющиеся представления о возможностях оценки и контроля функционального состояния микроводорослей в культурах и при исследовании морских биоценозов. Комплексное применение методов проточной цитометрии, относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* и стандартных методов определения ростовых показателей водорослей и их основных внутриклеточных компонентов позволило выделить ряд экспресс-индикаторов, которые обеспечивают интегральную характеристику состояния культур водорослей, выращенных в различных условиях, а также природного сообщества фитопланктона (на примере пико- и нанофракций) на протяжении всего годового цикла его развития в прибрежном районе Черного моря. Сравнительные исследования, выполненные в настоящей работе, показали, что такие параметры как FDA_f , F_v/F_m и количество жизнеспособных клеток в популяции могут быть использованы в качестве перспективных маркеров в целях диагностики состояния первично-продукционного звена водных экосистем.

ВЫВОДЫ

1. Успешно апробирован в экспериментах с модельными культурами водорослей и в полевом исследовании сообществ черноморского пико- и нанофитопланктона метод окрашивания водорослей диацетатом флуоресцеина (FDA) для дифференциации клеток с разной функциональной активностью, который позволил впервые использовать параметр удельной флуоресценции (FDA_{fl}) для экспресс контроля функционального состояния водорослей.

2. В культурах водорослей присутствуют клетки с разной функциональной активностью: активные, малоактивные и мертвые. Процент мёртвых клеток при оптимальных условиях роста составляет 1-2 % от общей биомассы водорослей для видов, имеющих ригидные кремне - или целлюлозосодержащие оболочки, и не превышает 0,5 % для клеток, окруженных цитоплазматической мембраной. При неблагоприятных условиях роста доля мёртвых и разрушенных клеток возрастает до 30 % для видов, имеющих клеточную оболочку и существенно меньше для видов без неё. Доля малоактивных клеток в разные моменты роста культур составляет от 40 % до 80 %.

3. Показана возможность применения параметра FDA_{fl} и максимальной квантовой эффективности фотосинтеза (Fv/Fm) как возможных индикаторов контроля физиологического состояния водорослей в широком градиенте условий среды: от оптимальных до экстремальных условий. При высокой интенсивности света и высокой температуре, а также в условиях азотного лимитирования коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла значительно снижается, тогда как величина флуоресценции FDA - более устойчивый параметр. Высокий уровень эстеразной активности в клетках сохраняется при исчерпании внутриклеточных запасов азота, и практически при отсутствии скорости роста водорослей и синтеза хлорофилла *a*. Действие светового и температурного

факторов на флуоресценцию FDA проявляется только при крайних значениях, имеющих летальный или близкий к ним характер, что позволяет использовать этот показатель как индикатор жизнеспособности водорослей при экстремальных условиях.

4. В стационарной фазе роста при высокой интенсивности света и низкой температуре наблюдается высокая степень гетерогенности клеточных объемов водорослей. Коэффициент вариации объема клеток водорослей может служить показателем физиологического состояния популяции.

5. Доля жизнеспособных клеток в пико и нанофитопланктоне в прибрежных водах Черного моря составила в среднем 80 %, что указывает на относительную стабильность функционирования сообщества в годовом цикле. В теплый период года в черноморском альгоценозе наиболее активен пикофитопланктон, в то время как холодный период благоприятен для развития нанофитопланктона.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

N – численность микроводорослей

V – объем клеток водорослей

H – высота клеток водорослей

D – диаметр клеток водорослей

FL1 – флуоресценция клеток в зеленой области спектра (525 нм)

FL2 – флуоресценция клеток в оранжевой области спектра (575 нм)

FL4 – флуоресценция клеток в красной области спектра (675 нм)

FS – прямое рассеяние

SS – боковое рассеяние

FDA – диацетат флуоресцеина

T – температура

I – интенсивность света

ФАР – фотосинтетически активная радиация

ФСА – фотосинтетический аппарат

μ , сут⁻¹ – удельная скорость роста

DMSO (ДМСО) – диметилсульфоксид

НАДН – восстановленный никотин амидаденин динуклеотид

НАДФН – восстановленный никотин амидаденин динуклеотид фосфат

НАД – никотин амидаденин динуклеотид

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

кл. – клетки

мг – миллиграмм

мин – минута

мкг – микрограмм

мкм – микрометр

ФНВ – фотосинтетически неактивная взвесь

C/Хл—отношение между органическим углеродом и хлорофиллом *a* в фитопланктоне

C/N—атомарное отношение между органическим углеродом и азотом

Хл *a* — хлорофилл *a*

F₀ — интенсивность флуоресценции при открытых реакционных центрах

F_m — интенсивность флуоресценции при закрытых реакционных центрах

F_v — переменная флуоресценция хлорофилла равная F_m - F₀

F_v/F_m — относительная переменная флуоресценция хлорофилла *a*

ФС1 — фотосистема 1

ФС2 — фотосистема 2

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Айздайчер, Н.А. Жизнеспособность морских микроводорослей в зависимости от условий хранения : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Нина Александровна Айздайчер. – Владивосток, 1987. – 19 с.
2. Айздайчер, Н.А. Жизнеспособность морских микроводорослей в зависимости от условий хранения : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Нина Александровна Айздайчер. – Владивосток, 1987. – 147 с.
3. Андреева, В.М. Род *Chlorella*: морфология, систематика, принципы классификации / В.М. Андреева. – Ленинград : Наука, Ленингр. отд-ние, 1975. – 110 с.
4. Белевич, Т.А. Параметры флуоресценции беломорского фитопланктона при разных источниках азота / Т.А. Белевич, В.А. Осипов // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера : материалы междунар. науч. конф., 5–8 октября 2009 г. – Петрозаводск, 2009. – С. 80-84.
5. Брянцева, Ю.В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря / Ю.В. Брянцева, А.М. Лях, А.В. Сергеева ; Ин-т биологии юж. морей им. А.О. Ковалевского. – Севастополь, 2005. – 25 с.
6. Вассер, С.П. Водоросли. Справочник / С.П. Вассер, Н.В. Кондратьева, Н.П. Масюк. – Киев : Наукова думка, 1989. – 608 с.
7. Веселова, Т.В. Вариабельность как тест перехода клетки в состояние стресса в условиях интоксикации / Т.В. Веселова, В.А. Веселовский, В.В. Власенко, В.И. Мацкивский, Ф.М. Пеньков, Д.С. Чернавский // Физиология растений. – 1990. – Т. 37, № 4. – С. 733-738.
8. Веселовский, В.А. Структурно-функциональные изменения мембран растительной клетки при адаптации к повреждающим воздействиям : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.02; 03.00.12 / Владимир Александрович

- Веселовский. – Москва, 1990. – 155 с.
9. Владимирова, М.Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей (инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фото- автотрофных одноклеточных водорослей) / М.Г. Владимирова, В.Е. Семененко. – Москва : АН СССР, 1962. – 60 с.
 10. Воронова, Е.Н. Изменения параметров флуоресценции хлорофилла диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* при фотоадаптации и фотоповреждении : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Елена Николаевна Воронова. – Москва, 2005. – 29 с.
 11. Воронова, Е.Н. Внутрипопуляционная гетерогенность параметров флуоресценции у морской планктонной водоросли *Thalassiosira weissflogii* при разной обеспеченности азотом / Е.Н. Воронова, Л.В. Ильяш, С.И. Погосян, А.Ю. Уланова, Д.Н. Маторин, Ман-Ги Чо, А.Б. Рубин // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 4. – С. 469–478.
 12. Гаврилова, О.В. Влияние спектрального состава света на морфогенез коккоидных зеленых водорослей (Chlorophyta) / О.В. Гаврилова, Е.Е. Рудакова // Альгология. – 2011. – Т. 11, № 2. – С. 165–175.
 13. Гапочка, Л.Д. Популяционные аспекты устойчивости микроводорослей к токсическим воздействиям / Л.Д. Гапочка, О.Б. Шавырина // Альгология. – 1999. – Т. 9, № 2. – С. 31.
 14. Горюнова, С.В. Применение метода флуоресцентной микроскопии для определения живых и мертвых клеток водорослей / С.В. Горюнова // Труды института микробиологии. – 1952. – Т. 2. – С. 64-57.
 15. Горюнова, С.В. Применение метода флуоресцентной микроскопии для определения живых и мёртвых клеток водорослей / С.В. Горюнова // Вестник АН СССР. – 1951. – Т. 6. – С. 100–102.
 16. Демидов, А.Б. Продукционные характеристики фитопланктона в Южной Атлантике и атлантическом секторе Южного океана летом 2009 2010 гг / А.Б. Демидов, С.А. Мошаров, В.И. Гагарин // Океанология. – 2012. – Т. 52, № 2. – С. 226-226.

17. Дмитриева, А.Г. Метод биотестирования по определению живых и мертвых клеток водорослей с помощью люминесцентной микроскопии / А.Г. Дмитриева // Методы биотестирования вод. – Черноголовка, 1988. – С. 85-89.
18. Ждан-Пушкина, С.М. Некоторые аспекты роста культур микроорганизмов / С.М. Ждан-Пушкина, Л.А. Хасанова. — Уфа : [Б.и.], 1991. — 126 с.
19. Запара, Е.В. Динамика лабораторных и природных сообществ планктонных водорослей в зависимости от обеспеченности органическим и минеральным азотом : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Елена Вячеславовна Запара. – Москва, 2009. – 22 с.
20. Запара, Е.В. Динамика флуоресцентных параметров диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* в зависимости от источника азота в условиях дефицита световой энергии / Е.В. Запара, В.А.Осипов // Человечество и окружающая природа : сб. науч. работ по докл. междунар. конф. – Москва, 2004. – С. 432–433 с.
21. Кобленц-Мишке, О.И. Фотосинтетическая первичная продукция / О.И. Кобленц-Мишке // Биологические ресурсы океана / под ред. П.А. Моисеева. – Москва : Агропромиздат, 1985. – С. 48–62.
22. Ковалева, М.К. Эффект гормезиса у *Dunaliella viridis* Teodor. (Chlorophyta) под действием сернокислой меди / М.К. Ковалева, Н.Г. Мензянова, А.И. Божков // Альгология. – 2011. – Т. 71, № 3. – С. 277-294.
23. Конюхов, И.В. Изменение параметров флуоресценции диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* в процессе роста при разных условиях облучения и минерального питания : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Иван Владимирович Конюхов. – Москва, 2009. – 26 с.
24. 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.
25. Курочкина, В.А. Внутрипопуляционная изменчивость функциональных и

- морфологических параметров водорослей *Conticribra weissflogii* и *Attheya ussurensis* при осмотическом стрессе : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.10 / Виктория Александровна Курочкина. – Москва, 2019. – 135 с.
26. Лакин, Г.Ф. Биометрия. 4-е изд. / Г.Ф. Лакин. – Москва : Высшая школа, 1990. – 352 с.
 27. Луста, К.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / К.А. Луста, Б. А. Фихте. – Пушкино : ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
 28. Мамаев С.А. Основные принципы методики исследования внутривидовой изменчивости древесных растений / С.А. Мамаев // Индивидуальная и эколого-географическая изменчивость растений. – Свердловск : УНЦ АН СССР, 1975. – С. 3-14.
 29. Марушкина, Е.В. Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Екатерина Викторовна Марушкина. – Москва, 2005. – 21 с.
 30. Маторин, Д.Н. Использование зависимостей параметров флуоресценции хлорофилла от освещенности для изучения фотосинтетической активности фитопланктона (на примере водоемов Звенигородской станции МГУ) / Д.Н. Маторин., В.А. Осипов, О.В. Яковлева, С.Н. Горячев, А.Б. Рубин // Вода: химия и экология. – 2011. – № 4. – С. 44-49.
 31. Маторин, Д.Н. Флуоресценция хлорофилла для биодиагностики растений / Д.Н. Маторин, А.А. Алексеев. – Москва : ООО «ПКЦ Альтекс», 2013. – 364 с.
 32. Микаэлян, А.С. Развитие кокколитофорид в Черном море: межгодовые и многолетние изменения / А.С. Микаэлян, В.А. Силкин, Л.А. Паутова // Океанология. – 2011. – Т. 51, № 1. – С. 45-53.
 33. Муханов, В.С. Структура и сезонная трофодинамика пикофитопланктона в Севастопольской бухте и сопредельных водах Черного моря / В.С. Муханов, О.А. Рылькова, Т.Я. Чурилова, Е.Г. Сахонь, Н.В. Пименов // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 5. – С. 512-521.

34. Никольский, Б.П. Справочник химика. / Б.П. Никольский. – Ленинград : Госхимиздат, 1952. – Т. 3. – 1191 с.
35. Орадовский, С.Г. Руководство по химическому анализу морских вод (РД52. 10.243-293) / С.Г. Орадовский. – Санкт-Петербург : Гидрометеиздат, 1993. – 264 с.
36. Осадчая, Т.С. Характеристика размерной структуры фитопланктона по измерениям хлорофилла “а” / Т.С. Осадчая // Экология моря. – 2007. – Вып. 73. – С. 70-74.
37. Осипов, В.А. Зависимость флуоресцентных параметров микроводорослей от факторов среды, включая антропогенные загрязнения : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16, 03.00.02 / Владимир Алексеевич Осипов. – Москва, 2006. – 22 с.
38. Парсонс, Т.Р. Биологическая океанография / Т.Р. Парсонс, М. Такахаша, Б. Харгрейв ; пер. с англ. В.В. Крылова, Л.Л. Кожинной. – Москва : Легкая промышленность, 1982. – 431 с.
39. Полетаев, А.И. Проточная цитометрия и сортировка клеток: современное состояние и перспективы использования в молекулярной биологии / А.И. Полетаев, Н.В. Гучев, А.В. Зеленин // Молекулярная биология. – 1987. – Т. 21. – С. 20.
40. Попова, А.Ф. Влияние катамина на структурно-функциональные характеристики клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang / А.Ф. Попова, Т.В. Паршикова, Р. Кемп // Альгология. – 2004. - Т. 14, № 3. – С. 229-239.
41. Прохоцкая, В. Ю. Структурно-функциональные характеристики модельной популяции *Scenedesmus quadricauda* при интоксикации : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / Валерия Юрьевна Прохоцкая. – Москва, 2000. – 135 с.
42. Радченко, И.Г. Рост и фотосинтетическая активность диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* при снижении солености / И.Г. Радченко, Ильяш Л.В. // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2006. – Т. 3, № 1. – С. 306-313.
43. Роухияйнен, М.И. Состав поверхностного фитопланктона Севастопольской

- бухты по результатам люминесцентного анализа / М.И. Роухияйнен // Экология моря. – 1988. – Вып. 28. – С. 15-18.
44. Рощин, А.М. Жизненные циклы диатомовых водорослей / А.М. Рощин. – Киев : Наукова думка, 1994а. – 170 с.
 45. Рубин, А.Б. Биофизические методы в экологическом мониторинге / А.Б. Рубин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 4. – С. 7-13.
 46. Сеничева, М.И. Динамика популяции *Skeletonema costatum* (Grev.) в Севастопольской бухте / М.И. Сеничева // Экология моря. - 1980. - Вып. 1. – С. 11-15.
 47. Соломонова, Е.С. Исследование применимости относительной переменной флуоресценции хлорофилла и окрашивания диацетатом флуоресцеина для оценки и контроля состояния культуры водорослей на примере *Phaeodactylum tricornutum* / Е.С. Соломонова, А.И. Акимов, Н. Ю. Шоман // Ботанический журнал. – 2018. – Т. 103, № 9. – С. 1177-1191.
 48. Соломонова, Е.С. Оценка функционального состояния культуры *Chlorella vulgaris Suboblunga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции / Е.С. Соломонова, А.И. Акимов // Морской экологический журнал. – 2014. - Т. 11, № 4. – С. 78–84.
 49. Соломонова, Е.С. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* с помощью проточной цитометрии / Е.С. Соломонова, В.С. Муханов // Морской экологический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 67–72.
 50. Стельмах, Л.В. Эколого-физиологические основы “цветения” воды, вызываемого *Emiliania huxleyi* в севастопольской бухте / Л.В. Стельмах, М.И. Сеничева, И.И. Бабич // Экология моря. – 2009. – Вып. 77. – С. 28-32.
 51. Стельмах, Л.В. Вклад пикопланктона в первичную продукцию и содержание хлорофилла "а" в эвтрофных водах на примере Севастопольской бухты / Л.В. Стельмах // Океанология. – 1988. – Т. 28, № 1. – С. 127–131.
 52. Тодоренко, Д.А. Изучение токсичности сульфата меди и наночастиц серебра

- с использованием флуоресценции микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* / Д.А. Тодоренко, Д.Н. Маторин, А.А. Алексеев, Д.И. Тунгатарова, В.С. Орлова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2014. – Т. 1. – С. 25-31.
53. Тыныбеков, А.К. Использование погружного зонда флуориметра при определении фитопланктона озера Иссык-Куль / А.К. Тыныбеков, Д.Н. Маторин, Ж.Э. Куленбеков // Вестник Кыргызско-Российского Словянского университета. – 2007. – Т. 7. – С. 127-132.
 54. Уголев, А.М. Естественные технологии биологических систем / А.М. Уголев. – Ленинград : Наука, Ленингр. отд-ние, 1987. – 317 с.
 55. Федоров, В.Д. Взаимоотношения водорослей и микроорганизмов. 1. Влияние развивающихся культур протококковых водорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus obliquus* на выживаемость кишечной палочки / В.Д. Федоров, С.Г. Кушнер, М.М. Телитченко // Научные доклады высшей школы. Биологические науки. – 1962. – Т. 2. – С. 160-165.
 56. Финенко, З.З. Оценка биомассы фитопланктона и первичной продукции в Чёрном море по спутниковым данным // З.З. Финенко, Т.Я. Чурилова, В.В. Суслин // Промысловые биоресурсы Чёрного и Азовского морей / под. ред. В.Н. Еремеева, А.В. Гаевской, Г.Е. Шульмана, Ю.А. Загородней. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 220–237.
 57. 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.
 58. 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. – Т. 9 (29). – С. 73-82.
 59. Шоман, Н.Ю. Влияние фотоадаптации на удельную скорость роста и

- соотношение органического углерода к хлорофиллу а у диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* / Н.Ю. Шоман, А.И. Акимов // Морской экологический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 97–103.
60. Abalde, J. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments / J. Abalde, A. Cid, S. Reiriz, E. Torres, C. Herrero // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1995. – Vol. 54, iss. 2. – P. 317-324.
 61. Agawin, N.S.R. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature / N.S.R. Agawin, C.M. Duarte, S. Agustí // Marine Ecology Progress Series. – 1998. – Vol. 170 – P. 45-53.
 62. Agawin, N.S.R. Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production / N.S.R. Agawin, C.M. Duarte, S. Agustí // Limnology and Oceanography. – 2000. – Vol. 45, iss. 3. – P. 591-600.
 63. Agustí, S. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe / S. Agustí, M.C. Sánchez // Limnology and Oceanography. – 2002. – Vol. 47, iss. 3. – P. 818-828.
 64. Agustí, S. Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis: evidence of high phytoplankton lysis rates in the northwestern Mediterranean / S. Agustí, M.P. Satta, M.P. Mura, E. Benavent // Limnology and Oceanography. – 1998. – Vol. 43, iss. 8. – P. 1836-1849.
 65. Agustí, S. Strong seasonality in phytoplankton cell lysis in the NW Mediterranean littoral / S. Agustí, C.M. Duarte // Limnology and Oceanography. – 2000. – Vol. 45, iss. 4. – P. 940-947.
 66. Agustí, S. Viability and niche segregation of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells across the Central Atlantic Ocean / S. Agustí // Aquatic Microbial Ecology. – 2004. – Vol. 36, iss. 1. – P. 53-59.
 67. Aizdaicher, N.A. The effect of decrease in salinity on the dynamics of abundance and the cell size of *Corethron hystrix* (Bacillariophyta) in laboratory culture /

- N.A. Aizdaicher, Z.V. Markina // Ocean Science Journal. – 2010. – Vol. 45, iss. 1. – P. 1-5.
68. Akimov, A.I. Characteristics of growth and fluorescence of certain types of algae during acclimation to different temperatures under culture conditions / A.I. Akimov, E.S. Solomonova // Oceanology. – 2019. – Vol. 59, iss. 3. – P. 316-326.
 69. Alonso-Laita, P. Contrasting patterns of phytoplankton viability in the subtropical NE Atlantic Ocean / P. Alonso-Laita, S. Agustí // Aquatic Microbial Ecology. – 2006. – Vol. 43, iss. 1. – P. 67-78.
 70. Antal, T.K. Assessment of the effects of methylmercury and copper ions on primary processes of photosynthesis in green microalga *Chlamydomonas moewusii* by analysis of the kinetic curves of variable chlorophyll fluorescence / T.K. Antal, E.E. Graevskaya, D.N. Matorin, A.A. Volgusheva, V.A. Osipov, T.E. Krendeleva, A.B. Rubin // Biophysics. – 2009. – Vol. 54, no. 4. – P. 481-485.
 71. Antal, T.K. Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer / T.K. Antal, P.S. Venediktov, D.N. Matorin, M. Ostrowska, B. Wozniak, A.B. Rubin // Oceanologia. – 2001. – Vol. 43, iss. 3. – P. 291-313.
 72. Arellano, J.B. The donor side of photosystem II as the copper-inhibitory binding site / J.B. Arellano, J.J. Lázaro, J. López-Gorgé, M. Baron // Photosynthesis Research. – 1995. – Vol. 45, iss. 2. – P. 127-134.
 73. Arsenault, G. Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry-based method / G. Arsenault, A.D. Cvetkovic, R. Popovic // Water Quality Research Journal of Canada. – 1993. – Vol. 28. – P. 757-765.
 74. Atkinson, D. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% C⁻¹ / D. Atkinson, B.J. Ciotti, D.J.S. Montagnes // Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 2003. – Vol. 270. – P. 2605-2611.
 75. Banse, K. Cell volumes, maximal growth rates of unicellular algae and ciliates, and the role of ciliates in the marine pelagial1, 2 / K. Banse // Limnology and Oceanography. – 1982. – Vol. 27, iss. 6. – P. 1059-1071.
 76. Banse, K. Rates of growth, respiration and photosynthesis of unicellular algae as

- related to cell size—a review^{1, 2} / K. Banse // *Journal of Phycology*. – 1976. – Vol. 12, iss. 2. – P. 135-140.
77. Bentley-Mowat, J. A. Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton / J.A. Bentley-Mowat // *Botanica Marina*. – 1982. – Vol. 25. – P. 203-204.
 78. Berges, J.A. Effects of temperature on growth rate, cell composition and nitrogen metabolism in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* / J.A. Berges, D.E. Varela, P.J. Harrison // *Marine Ecology Progress Series*. – 2002. – Vol. 225. – P. 139-146.
 79. Berges, J.A. Physiological stress and cell death in marine phytoplankton: induction of proteases in response to nitrogen or light limitation / J.A. Berges, P.G. Falkowski // *Limnology and Oceanography*. – 1998. – Vol. 43, iss. 1. – P. 129-135.
 80. Blaise, C. Micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments / C. Blaise, L.A. Menard // *Water Quality Research Journal of Canada*. – 1998. – Vol. 33, iss. 1. – P. 133-151.
 81. Bray, D.F. Ultrastructure of *Chlamydomonas reinhardtii* following exposure to paraquat: comparison of wild type and a paraquat-resistant mutant / D.F. Bray, J.R. Bagu, K. Nakamura // *Canadian Journal of Botany*. – 1993. – Vol. 71, iss. 1. – P. 174-182.
 82. Brehm-Stecher, B.F. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications / B.F. Brehm-Stecher, E.A. Johnson // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2004. – Vol. 68, iss. 3. – P. 538-559.
 83. Brussaard, C.P.D. Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web / C.P.D. Brussaard, R. Riegman, A.A.M. Noordeloos, G.C. Cadée, H. Witte, A.J. Kop, R.P.M. Bak // *Marine Ecology Progress Series*. – 1995. – Vol. 123. – P. 259-271.
 84. Bucci, V. Microscale patchiness leads to large and important intraspecific internal nutrient heterogeneity in phytoplankton / V. Bucci, D. Nunez-Milland, B. S. Twining, F.L. Hellweger // *Aquatic Ecology*. – 2012. – Vol. 46, iss. 1. – P. 101-

- 118.
85. Burke, I.C. Regional and temporal variation in net primary production and nitrogen mineralization in grasslands / I.C. Burke, W.K. Lauenroth, W.J. Parton // *Ecology*. – 1997. – Vol. 78, iss. 5. – P. 1330-1340.
 86. Campbell, D. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins / D. Campbell, M.J. Eriksson, G. Öquist, P. Gustafsson, A.K. Clarke // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – Vol. 95, iss. 1. – P. 364-369.
 87. Carvalho, W.F. Acidotropic probes and flow cytometry: a powerful combination for detecting phagotrophy in mixotrophic and heterotrophic protists / W.F. Carvalho, E. Granéli // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2006. – Vol. 44, iss. 1. – P. 85-96.
 88. Chalifour, A. Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine / A. Chalifour, P. Juneau // *Aquatic Toxicology*. – 2011. – Vol. 103, iss. 1-2. – P. 9-17.
 89. Chepurnov, V.A. Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms / V.A. Chepurnov, D.G. Mann // *Phycological Research*. – 2004. – Vol. 52, iss. 1. – P. 1-12.
 90. Chisholm, S.W. Phytoplankton size / S.W. Chisholm // *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea* / Eds: P.G. Falkowski, A.D. Woodhead. – New York : Plenum Press, 1992. – P. 213-237. – (Environmental science research ; vol. 43).
 91. Cid, A. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry / A. Cid, P. Fidalgo, C. Herrero, J. Abalde // *Cytometry*. – 1996. – Vol. 25. – P. 32-36.
 92. Claquin, P. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae / P. Claquin, I. Probert, S. Lefebvre, B. Veron, // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2008. – Vol. 51. – P. 1-11.

93. Clarke, A.K. Dynamic responses of photosystem II and phycobilisomes to changing light in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 / A.K. Clarke, D. Campbell, P. Gustafsson, G. Öquist // *Planta*. – 1995. – Vol. 197, iss. 3. – P. 553-562.
94. Claustre, H. Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: Possible ecological implications / H. Claustre, J. Gostan // *Marine Ecology Progress Series*. – 1987. – Vol. 40, iss. 1. – P. 167-174.
95. Davey, H.M. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses / H.M. Davey, D.B. Kell // *Microbiological Reviews*. – 1996. – Vol. 60, iss. 4. – P. 641–696.
96. Dorsey, J. Rapid analytical technique for the assessment of cell activity in marine microalgae / J. Dorsey, C.M. Yentsch, S. Mayo, C. McKenna // *Cytometry*. – 1989. – Vol. 10, iss. 5. – P. 622-628.
97. Erga, S. R. Nutrients and phytoplankton biomass distribution and activity at the Barents Sea Polar Front during summer near Hopen and Storbanken / S. R. Erga, N. Ssebiyonga, B. Hamre, Ø. Frette, F. Rey, K. Drinkwater // *Journal of Marine Systems*. – 2014. – Vol. 130. – P. 181-192.
98. Esperanza, M. *Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress / M. Esperanza, M. Seoane, C. Rioboo, C. Herrero, A. Cid // *Aquatic Toxicology*. – 2015. – Vol. 165. – P. 64-72.
99. Falkowski, P.G. Aquatic photosynthesis. Second edition / P.G. Falkowski, J.A. Raven. – Princeton : Princeton University Press, 2007. – 484 p.
100. Falkowski, P.G. Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans / P.G. Falkowski, Z. Kolber // *Functional Plant Biology*. – 1995. – Vol. 22, iss. 2. – P. 341-355.
101. Franklin, D.J. Identification of senescence and death in *Emiliania huxleyi* and *Thalassiosira pseudonana*: Cell staining, chlorophyll alterations, and dimethylsulfoniopropionate (DMSP) metabolism / D.J. Franklin, R.L. Airs, M. Fernandes, T.G. Bell, R.J. Bongaerts, J.A. Berges, G. Malin // *Limnology and Oceanography*. – 2012. – Vol. 57, iss. 1. – P. 305-317.

102. Franklin, D.J. Mortality in cultures of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* during culture senescence and darkness / D.J. Franklin, J.A. Berges // Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. – 2004. – Vol. 271. – P. 2099-2107.
103. Franklin, D.J. What is the role and nature of programmed cell death in phytoplankton ecology? / D.J. Franklin, C.P.D. Brussaard, J.A. Berges // European Journal of Phycology. – 2006. – Vol. 41, iss. 1. – P. 1-14.
104. Franklin, D.J. Effect of dead phytoplankton cells on the apparent efficiency of photosystem II / D.J. Franklin, C.J. Choi, C. Hughes, G. Malin, J.A. Berges // Marine Ecology Progress Series. – 2009. – Vol. 382. – P. 35-40.
105. Franqueira, D. A comparison of the relative sensitivity of structural and functional cellular responses in the alga *Chlamydomonas eugametos* exposed to the herbicide paraquat / D. Franqueira, A. Cid, E. Torres, M. Orosa, C. Herrero // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 1999. – Vol. 36, iss. 3. – P. 264-269.
106. Franqueira, D. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae / D. Franqueira, M. Orosa, E. Torres, C. Herrero, A. Cid // Science of the Total Environment. – 2000. – Vol. 247 iss. 2-3. – P. 119-126.
107. Friedman, A.L. A diatom light-harvesting pigment-protein complex: purification and characterization / A.L. Friedman, R.S. Alberte // Plant Physiology. – 1984. – Vol. 76, iss. 2. – P. 483-489.
108. Friedman, A.L. Biogenesis and light regulation of the major light harvesting chlorophyll-protein of diatoms / A.L. Friedman, R.S. Alberte // Plant Physiology. – 1986. – Vol. 80, iss. 1. – P. 43-51.
109. From, N. Removing the light history signal from normalized variable fluorescence (Fv/Fm) measurements on marine phytoplankton / N. From, K. Richardson, E.A. Mousing, P.E. Jensen // Limnology and Oceanography: Methods. – 2014. – Vol. 12. – P. 776-783.
110. 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.
111. Garrido, M. Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry / M. Garrido, P. Cecchi, A. Vaquer, V. Pasqualini // Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers. – 2013. – Vol. 71. – P. 38-48.
 112. Garvey, M. Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions / M. Garvey, B. Moriceau, U. Passow // Marine Ecology Progress Series. – 2007. – Vol. 352. – P. 17–26.
 113. Gasol, J.M. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria / J.M. Gasol, U.L. Zweifel, F. Peters, J.A. Fuhrman, Å. Hagström // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Vol. 65, iss. 10. – P. 4475-4483.
 114. Geary, S. The use of FDA and flow cytometry to measure the metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* / S. Geary, G. Ganf, J. Brookes // Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen. – 1998. – Vol. 26, iss. 5. – P. 2367-2369.
 115. Gechev, T.S. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death / T.S. Gechev, Van Breusegem, F. Stone, I. Denev, C. Laloi // Bioessays. – 2006. – Vol. 28, iss. 11. – P. 1091-1101.
 116. Geider, R.J. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation / R.J. Geider, J. Roche, R.M. Greene, M. Olaizola // Journal of Phycology. – 1993. – Vol. 29, iss. 6. – P. 755-766.
 117. Geitler, L. Cyanophyceae / L. Geitler // Kryptogramenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. – 1932. – Vol. 14. – P. 130-148.
 118. Gilbert, F. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ectotoxicological tests and evaluation of water quality / F. Gilbert, F. Galgani, Y. Cadiou // Marine Biology. – 1992. – Vol. 112, iss. 2. – P. 199–205.

119. Givan, A.L. Flow cytometry: An introduction / A.L. Givan // Flow Cytometry Protocols. 3^d ed. / Eds: T.S. Hawley, R.G. Hawley. – New York : Humana Press, 2011. – P. 1-31.
120. Glover, H.E. The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones / H.E. Glover, M.D. Keller, R.W. Spinrad // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1987. – Vol. 105, iss. 2-3. – P. 137-159.
121. González-Barreiro, Ó. Atrazine-induced chlorosis in *Synechococcus elongatus* cells / Ó. González-Barreiro, C. Rioboo, A. Cid, C. Herrero // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2004. – Vol. 46, iss. 3. – P. 301-307.
122. Grasshoff, K. Methods of seawater analysis. 2nd rev. and extended ed / K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling. – Weinheim : Verlag Chemie, 1983. – 419 p.
123. Greene, R. M. Physiological limitation of phytoplankton photosynthesis in the eastern equatorial Pacific determined from variability in the quantum yield of fluorescence / R.M. Greene, Z.S. Kolber, D.G Swift, N.W. Tindale // Limnology and Oceanography. – 1994. – Vol. 39, iss. 5. – P. 1061-1074.
124. Guillard, R.R.L. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* and *Detonula confervacea* / R.R.L. Guillard, J.H. Ryther // Canadian Journal of Microbiology. – 1962. – Vol. 8. – P. 229-239.
125. Haberkorn, H. Flow cytometric measurements of cellular responses in a toxic dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses / H. Haberkorn, H. Hégaret, D. Marie, C. Lambert, P. Soudant // Harmful Algae. – 2011. – Vol. 10, iss. 5. – P. 463-471.
126. Håkansson, H. A study of variation in valve morphology of the diatom *Cyclotella meneghiniana* in monoclonal cultures: effect of auxospore formation and different salinity conditions / H. Håkansson, V.A. Chepurnov // Diatom Research. – 1999. – Vol. 14, iss. 2. – P. 251-272.

127. Hancke, K. Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production pulse-amplitude-modulated fluorescence and ¹⁴C assimilation / K. Hancke, T.B. Hancke, L.M. Olsen, G. Johnsen, R.N. Glud // *Journal of Phycology*. – 2008. – Vol. 44, iss. 2. – P. 501-514.
128. Heldal, M. Elemental composition of single cells of various strains of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus* using X-ray microanalysis / M. Heldal, D.J. Scanlan, S. Norland, F. Thingstad, N.H. Mann, // *Limnology and Oceanography*. – 2003. – Vol. 48, iss. 5. – P. 1732-1743.
129. Helson–Harrison, J. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure / J. Helson–Harrison, Y. Helson–Harrison, K.R. Shivanna // *Theoretical and Applied Genetics* – 1984. – Vol. 67, iss. 4. – P. 367-375.
130. Hideg, É. The irreversible photoinhibition of the photosystem II complex in leaves of *Vicia faba* under strong light / É. Hideg, N. Murata // *Plant Science*. – 1997. – Vol. 130. – P. 151-158.
131. Hjorth, M. Effects on the function of three trophic levels in marine plankton communities under stress from the antifouling compound zinc pyrithione / M. Hjorth, I. Dahllöf, V.E. Forbes // *Aquatic Toxicology*. – 2006. – Vol. 77, iss. 1. – P. 105-115.
132. Holzapfel-Pschorn, A. Sensitive methods for the determination of microbial activities in water samples using fluorogenic substrates / A. Holzapfel-Pschorn, U. Obst, K. Haberer // *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*. – 1987. – Vol. 327, iss. 5-6. – P. 521-523.
133. Hyka, P. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae / P. Hyka, S. Lickova, P. Přibyl, K. Melzoch, K. Kovar // *Biotechnology Advances*. – 2013. – Vol. 31. – P. 2-16.
134. Iglesias-Prieto, R. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture / R. Iglesias-Prieto, J.L. Matta, W.A. Robins, R.K. Trench // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – Vol. 89, iss. 21. – P. 10302-10305.

135. 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.
136. Jochem, F. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate / F. Jochem // *Marine Biology*. – 1999. – Vol. 135. – P. 721–728.
137. Khona, D.K. Characterization of salt stress-induced palmelloids in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* / D.K. Khona, S.M. Shirolkar, K.K Gawde, E. Hom, M.A. Deodhar, J.S. D'Souza // *Algal Research*. – 2016. – Vol. 16. – P. 434-448.
138. Kirchman, D.L. Phytoplankton death in the sea / D.L. Kirchman // *Nature*. – 1999. – Vol. 398, iss. 6725. – P. 293-294.
139. Kok, B. Photoinhibition of chloroplast reactions / B. Kok, E.S. Gassner, H.J. Rurainski // *Photochemistry and photobiology*. – 1965. – Vol. 4. – P. 215-227.
140. 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.
141. Kolber, Z. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ / Z. Kolber, P.G. Falkowski // *Limnology and Oceanography*. – 1993. – Vol. 38. – P. 1646-1665.
142. Kromkamp, J. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence / J. Kromkamp, C. Barranguet, J. Peene // *Marine Ecology Progress Series*. – 1998. – Vol. 162. – P. 45-55.
143. Kromkamp, J. Estimating phytoplankton primary production in Lake Jsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques / J. Kromkamp, N.A. Dijkman, J. Peene, S.G. Simis, H.J. Gons // *European Journal of Phycology*. – 2008. – Vol. 43. – P. 327-344.
144. Kruskopf, M. Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate / M.

- Kruskopf, K.J. Flynn // *New Phytologist*. – 2006. – Vol. 169, iss. 3. – P. 525-536.
145. Kulk, G. Low nutrient availability reduces high-irradiance-induced viability loss in oceanic phytoplankton / G. Kulk, van de Poll, W.H., Visser, A.G. Buma // *Limnology and Oceanography*. – 2013. – Vol. 58, iss. 5. – P. 1747-1760.
 146. Langan, M.M. Hoagland K. D. Growth responses of *Typha latifolia* and *Scirpus acutus* to atrazine contamination / M.M. Langan, K. D. Hoagland // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1996. – Vol. 57, iss. 2. – P. 307-314.
 147. Latour, D. Frequency of dividing cells and viability of *Microcystis aeruginosa* in sediment of a eutrophic reservoir / D. Latour, H. Giraudet, J.L. Berthon // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2004. – Vol. 36, iss. 2. – P. 117-122.
 148. Li, J. Applicability of the fluorescein diacetate assay for metabolic activity measurement of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) / J. Li, D. Ou, L. Zheng // *Phycological Research*. – 2011. – Vol. 59, iss. 3. – P. 200-207.
 149. Lippemeier, S. In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis / S. Lippemeier, R. Hintze, K. Vanselow, P. Hartig, F. Colijn // *European Journal of Phycology*. – 2001. – Vol. 36. – P. 89-100.
 150. Liu, C.P. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324 / C.P. Liu, L.P. Lin // *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. – 2001. – Vol. 42. – P. 207-214.
 151. Llabrés, M. Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: evidence for oceanic Atlantic communities / M. Llabrés, S. Agustí // *Limnology and Oceanography*. – 2006. – Vol. 51, iss. 1. – P. 21-29.
 152. Lu, C.M. Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium, *S. platensis*—assessment by chlorophyll fluorescence analysis / C.M. Lu, C.W. Chau, J.H. Zhang // *Chemosphere*. – 2000. – Vol. 41, iss. 1-2. – P. 191-196.
 153. Marie, D. Phytoplankton cell counting by flow cytometry / D. Marie, N. Simon, D. Vaultot // *Algal Culturing Techniques* / Ed. R. Andersen. – New York :

- Academic Press, 2005. – Chapt. 17. – P. 253-267.
154. Matorin, D.N. Application of chlorophyll fluorescence in studied of phytoplankton in the Mediterranean Sea // D.N. Matorin, N. Vuksanovich, A.B. Rubin, P.S. Venediktov // *Studia Marina*. – 2002. – Vol. 23. – P. 79-86.
 155. Matorin, D.N. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae / D.N. Matorin, T.K. Antal, M. Ostrowska, A.B. Rubin, D. Ficek // *Oceanologia*. – 2004. – Vol. 46, iss. 4. – P. 519-531.
 156. Maxwell, D.P. Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris* / D.P. Maxwell, S. Falk, C.G. Trick, N.P. Huner // *Plant Physiology*. – 1994. – Vol. 105, iss. 2. – P. 535-543.
 157. McAuley, P.J. The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. I. The relationship between host feeding and algal cell growth and division / P.J. McAuley // *Journal of Cell Science*. – 1985. – Vol. 77. – P. 225-239.
 158. McQuoid, M. Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord / M. McQuoid, A. Godhe, K. Nordberg // *European Journal of Phycology*. – 2002. – Vol. 37. – P. 191-201.
 159. Medhioub, W. *Alexandrium ostenfeldii* growth and spirolide production in batch culture and photobioreactor / W. Medhioub, V. Sechet, P. Truquet, M. Bardouil, Z. Amzil, P. Lassus, P. Soudant // *Harmful Algae*. – 2011. – Vol. 10, iss. 6. – P. 794-803.
 160. Montagnes, D.J.S. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: reconsidering some paradigms / D.J.S. Montagnes, M. Franklin // *Limnology and Oceanography*. – 2001. – Vol. 46, iss. 8. – P. 2008-2018.
 161. Morris, E.P., Kromkamp J. C. Influence of temperature on the relationship between oxygen-and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*) / E.P. Morris, J.C. Kromkamp // *European Journal of Phycology*. – 2003. – Vol. 38, iss. 2. – P. 133-142.

162. Myklestad, S.M. Dissolved organic carbon from phytoplankton / S.M. Myklestad // Marine Chemistry / Ed. P.J. Wangersky. – Berlin : Springer-Verlag, 2000. – P. 111-148. – (The Handbook of Environmental Chemistry ; vol. 5, pt. D).
163. Nancharaiah, Y.V. Single cell level microalgal ecotoxicity assessment by confocal microscopy and digital image analysis / Y.V. Nancharaiah, M. Rajadurai, V.P. Venugopalan // Environmental Science and Technology. – 2007. – Vol. 41, iss. 7. – P. 2617-2621.
164. Newell, R.C. Rate of degradation and efficiency of conversion of phytoplankton debris by marine microorganisms / R.C. Newell, M.I. Lucas, E.A.S. Linley // Marine Ecology Progress Series. – 1981. – Vol. 6. – P. 123-136.
165. Northcote, D.H. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa* / D.H. Northcote, K.J. Goulding, R.W. Horne // Biochemical Journal. – 1958. – Vol. 70, iss. 3. – P. 391-397.
166. Onji, M. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton / M. Onji, T. Sawabe, Y. Ezura // Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University. – 2000. – Vol. 51, iss. 3. – P. 151–158.
167. Ormerod, M.G. Flow cytometry / M.G. Ormerod // Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine. – 2006. – Suppl. 4: Cell Biology. – P. 415-438.
168. Østergaard, J.M. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities / J.M. Østergaard, Ø. Moestrup // European Journal of Phycology. – 1997. – Vol. 32. – P. 9-18.
169. Ostrowska, M. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 1. Theory of classical in situ chlorophyll fluorometry / M. Ostrowska, R. Majchrowski, D. N Matorin, B. Wozniak // Oceanologia. – 2000. – Vol. 42, iss. 2. – P. 209-219.
170. Overnell, J. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum* / J. Overnell // Marine Biology. – 1975. – Vol. 29, iss. 1. – P. 99-103.
171. Owens, T.G. Energy transformation and fluorescence in photosynthesis / T.G.

- Owens // Particle Analysis in Oceanography / Ed. S. Demers. – Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 1991. – P. 101-137. – (NATO ASI ser. Ser. G. Ecological sciences ; vol. 27).
172. Parkhill, J.P. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress / J.P. Parkhill, G. Maillet, J.J. Cullen // Journal of Phycology. – 2001. – Vol. 37, iss. 4. – P. 517-529.
 173. Partensky, F. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review / F. Partensky, J. Blanchot, D. Vaultot // Bulletin de l'Institut Océanographique de Monaco, (n° spécial 19). – 1999. – P. 457-476.
 174. Peperzak, L. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton / L. Peperzak, C.P.D. Brussaard // Journal of Phycology. – 2011. – Vol. 47, iss. 3. – P. 692-702.
 175. Peterson, S.M. New algal enzyme bioassay for the rapid assessment of aquatic toxicity / S.M. Peterson, J.L. Stauber // Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. – 1996. – Vol. 56, iss. 5. – P. 750-757.
 176. Pick, F.R. Picoplankton and nanoplankton biomass in Lake Ontario: relative contribution of phototrophic and heterotrophic communities / F.R. Pick, D.A. Caron // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 1987. – Vol. 44, iss. 12. – P. 2164-2172.
 177. Pogosyan, S.I. Variability in the condition of the photosynthetic system of the Black Sea phytoplankton / S.I. Pogosyan, D.N. Matorin // Oceanology. – 2005. – Vol. 45, suppl. 1. – P. S139-S148.
 178. Powles, S.B. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light / S.B. Powles // Annual Review of Plant Physiology. – 1984. – Vol. 35, iss. 1. – P. 15-44.
 179. Prado, R. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis / R. Prado, C. Rioboo, C. Herrero, Á. Cid // Aquatic Toxicology. – 2011. – Vol. 102, iss. 1-2. – P. 10-17.
 180. Prado, R. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a

- microalga exposed to the herbicide paraquat / R. Prado, R. García, C. Rioboo, C. Herrero, J. Abalde, A. Cid // *Environment International*. – 2009. – Vol. 35, iss. 2. – P. 240-247.
181. Prado, R. Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants / R. Prado, R. García, C. Rioboo, C. Herrero, A. Cid // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2015. – Vol. 114. – P. 117-125.
 182. Prosperi, E. Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein / E. Prosperi, A.C. Croce, G. Bottiroli // *Cytometry*. – 1986. – Vol. 7, iss. 1. – P. 70-75.
 183. Raven, J.A. Algal and aquatic plant carbon concentrating mechanisms in relation to environmental change / J.A. Raven, M. Giordano, J. Beardall, S.C. Maberly // *Photosynthesis Research*. – 2011. – Vol. 109, iss. 1, 3. – P. 281-296.
 184. Rioboo, C. Cell proliferation alterations in *Chlorella cells* under stress conditions / C. Rioboo, J. E. O'Connor, R. Prado, C. Herrero, A. Cid // *Aquatic Toxicology*. – 2009. – Vol. 94. – P. 229-237.
 185. Rotman, B. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters / B. Rotman, B.W. Papermaster // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1966. – Vol. 55, iss. 1. – P. 134-141.
 186. Sanità Di Toppi, L. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina* / L. Sanità Di Toppi, R. Musetti, Z. Vattuone, B. Pawlik-Skowrońska, F. Fossati, L. Bertoli, M.A. Favali // *Microscopy Research and Technique*. – 2005. – Vol. 66, iss. 1. – P. 229-238.
 187. Sayegh, F.A.Q. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition / F.A.Q. Sayegh, D.J.S. Montagnes // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, iss. 3. – P. 3007-3013.
 188. Schofield, O. Impact of temperature acclimation on photosynthesis in the toxic red-tide dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Ca28) / O. Schofield, J.

- Grzyski, M.M. Moline, R.V. Jovine // Journal of Plankton Research. – 1998. – Vol. 20, iss. 7. – P. 1241-1258.
189. Selvin, R. Use of fluorescein diacetate (FDA) as a single-cell probe of metabolic activity in dinoflagellate cultures / R. Selvin, B. Reguera, I. Bravo, C.M. Yentsch // Biological Oceanography. – 1989. – Vol. 6, iss. 5, 6. – P. 505-511.
 190. Shapiro, H.M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques / H.M. Shapiro // Journal of Microbiological Methods. – 2000. – Vol. 42. – P. 3-16.
 191. Shapiro, J. Current beliefs regarding dominance by blue-greens: the case for the importance of CO₂ and pH / J. Shapiro // Internationale Vereinigung für the Oretische und Angewandte Limnologie: Verhandlungen. – 1990. – Vol. 24, iss. 1. – P. 38-54.
 192. Shoman, N.Y. The dynamics of the intracellular contents of carbon, nitrogen, and chlorophyll a under conditions of batch growth of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897) at different light intensities / N.Y. Shoman // Russian Journal of Marine Biology. – 2015. – Vol. 41, iss. 5. – P. 356-362.
 193. Sicko-Goad, L. Diatom resting cell rejuvenation and formation: time course, species records and distribution / L. Sicko-Goad, E.F. Stoermer, J.P. Kociolek // Journal of Plankton Research. – 1989. – Vol. 11, iss. 2. – P. 375-389.
 194. Simon, M. Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean / M. Simon, F.O. Glöckner, R. Amann // Aquatic Microbial Ecology. – 1999. – Vol. 18, iss. 3. – P. 275-284.
 195. Smith, S.R. Flow cytometric analysis of phytoplankton viability in Elkhorn Slough : Master's Theses / S.R. Smith ; San Jose State University. – California, 2009. – 69 p.
 196. Stauber, J.L. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae / J.L. Stauber, T.M. Florence // Marine Biology. – 1987. – Vol. 94, iss. 4. – P. 511-519.
 197. Steenbergen, C.L.M. Light-dependent morphogenesis of unicellular stages in

- synchronized cultures of *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. (Chlorophyceae) / C.L.M. Steenbergen // Acta Botanica Neerlandica. – 1975. – Vol. 24, iss. 5-6. – P. 391-396.
198. Suggett, D.J. Fast repetition rate and pulse amplitude modulation chlorophyll a fluorescence measurements for assessment of photosynthetic electron transport in marine phytoplankton / D.J.Suggett, K. Oxborough, N.R. Baker, H.L. MacIntyre, T.M. Kana, R.J. Geider // European Journal of Phycology. – 2003. – Vol. 38, iss. 4. – P. 371-384.
 199. Sun, J. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton / J. Sun, D. Liu // Journal of Plankton Research. – 2003. – Vol. 25, iss. 11. – P 1331-1346.
 200. Suzuki, K. East west gradients in the photosynthetic potential of phytoplankton and iron concentration in the subarctic Pacific Ocean during early summer / K. Suzuki, H. Liu, T. Saino, H. Obata, M. Takano, K. Okamura, Y. Sohrin, Y. Fujishima // Limnology and Oceanography. – 2002. – Vol. 47, iss. 6. – P. 1581-1594.
 201. Takahashi, M. Shade and chromatic adaptation of phytoplankton photosynthesis in a thermally stratified sea / M. Takahashi, S. Ichimura, M. Kishino, N.Okami // Marine Biology. – 1989. – Vol. 100, iss. 3. – P. 401-409.
 202. Tang, Y.Z. Green autofluorescence in dinoflagellates, diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies / Y.Z. Tang, F.C. Dobbs // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – P. 2306-2313.
 203. Thiele, A. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light / A. Thiele, K. Schirwitz, K. Winter, G.H. Krause // Plant Science. – 1996. – Vol. 115, iss. 2. – P. 237-250.
 204. Trobajo, R. The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator / R. Trobajo, E.J. Cox, X.D. Quintana // Nova Hedwigia. – 2004. – Vol. 79, iss. 3-4. –

- P. 433-445.
205. van Boekelm, W.H.M. Lysis-induced decline of a *Phaeocystis* spring bloom and coupling with the microbial foodweb / W.H.M. van Boekelm, R. Riegman, R.P.M. Bak // Marine Ecology Progress Series. – 1992. – Vol. 81. – P. 269-276.
 206. Veldhuis, M.J. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth / M.J.W. Veldhuis, G.W. Kraay, K.R. Timmermans. // Journal of Phycology. – 2001. – Vol. 36, iss. 2. – P. 167–177.
 207. Verity, P.G. Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton / P.G. Verity, C.Y. Robertson, C.R. Tronzo, M.G. Andrews, J.R. Nelson, M.E. Sieracki // Limnology and Oceanography. – 1992. – Vol. 37, iss. 7. – P. 1434-1446.
 208. Viso, A.C. Fatty acids from 28 marine microalgae / A.C. Viso, J.C. Marty // Phytochemistry. – 1993. – Vol. 34, iss. 6. – P. 1521-1533.
 209. Vyverman, W. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms / W. Vyverman // International Review of Cytology. – 2004. – Vol. 237. – P. 91-154.
 210. Wakisaka, Y. Probing the metabolic heterogeneity of live *Euglena gracilis* with stimulated Raman scattering microscopy / Y. Wakisaka, Y. Suzuki, O. Iwata, A. Nakashima, T. Ito, M. Hirose, T. Shimobaba // Nature Microbiology. – 2016. – Vol. 1, iss. 10. – Art. no. 16124.
 211. Wang, Z.H. Germination of phytoplankton resting cells from surface sediments in two areas of the Southern Chinese coastal waters / Z.H. Wang, Y.H. Fu, W. Kang, J.F. Liang, Y.G. Gu, X.L. Jiang, // Marine Ecology. – 2013. – Vol. 34, iss. 2. – P. 218-232.
 212. Watras, C.J. Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarens* Lebour: Salinity-dependent temperature responses / C.J. Watras, S.W. Chisholm, D.M. Anderson // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1982. – Vol. 62, iss. 1. – P. 25-37.
 213. Worden, A.Z. Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component / A.Z. Worden, J.K. Nolan, B.

- Palenik // Limnology and Oceanography. – 2004. – Vol. 49. – P. 168-179.
214. Wyman, M. An in vivo method for the estimation of phycoerythrin concentrations in marine cyanobacteria (*Synechoccus spp.*) / M. Wyman // Limnology and Oceanography. – 1992. – Vol. 37, iss. 1. – P. 1300-1306.
 215. Yentsch, C.M. Flow Cytometry: Near real-time information about Ocean Biology / C.M. Yentsch // Oceanography. – 1990. – Vol. 3. – P. 47-50.
 216. Yentsch, C.M. Profiting from the visible spectrum / C.M. Yentsch, T.L. Cucci, F.C. Mague // Biological Oceanography. – 1989. – Vol. 6, iss. 5-6. – P. 477-492.
 217. Young, E.B. Rapid ammonium and nitrate induced perturbations to CHL a fluorescence in nitrogen stressed *Dunaliella Tertiolecta* (CHLOROPHYTA) 1 / E.B. Young, J. Beardall // Journal of Phycology. – 2003. – Vol. 39. – P. 332-342.
 218. Zhang, M. Photochemical responses of phytoplankton to rapid increasing-temperature process / M. Zhang, Y. Yu, Z. Yang, F. Kong // Phycological Research. – 2012. – Vol. 60, iss. 3. – P. 199-207.
 219. Zhao, M. Seasonal Change in phytoplankton communities in Tangxi Reservoir and the effecting factors [J] / M. Zhao, L. Lei, B. Han // Journal of Tropical and Subtropical Botany. – 2005. – Vol. 5. – P. 386-392.