

## ПАРАМЕТРЫ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛОМОРСКОГО ФИТОПЛАНКТОНА ПРИ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКАХ АЗОТА

Т.А. Белевич, В.А. Осипов

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, г. Москва, Россия  
e-mail: 3438083@list.ru

Первичная продукция в большинстве районов Мирового океана ограничена недостатком азота (Glibert, 1988). Азотное лимитирование приводит к снижению эффективности световых реакций фотосинтеза, уменьшению скорости фотосинтетической фиксации углерода и популяционного роста водорослей (Falkowski, Raven, 1997). В условиях недостатка минерального азота возрастает значимость потребления планктонными водорослями растворенного органического азота ( $N_{орг}$ ). При обширном объеме сведений о способности различных водорослей ассимилировать тот или иной содержащий азот органический субстрат (см., например, Antia et al., 1991), данные о динамике фотосинтетической активности и, в частности, световых реакций фотосинтеза, при потреблении  $N_{орг}$  практически отсутствуют.

Один из широко используемых подходов для определения эффективности световых реакций фотосинтеза – оценка параметров флуоресценции фотоавтотрофов. В частности, максимальная квантовая эффективность фотосистемы 2 (относительный выход переменной флуоресценции у адаптированных к темноте водорослей) отражает эффективность фотохимического преобразования энергии в реакционных центрах фотосистемы 2 (Falkowski, Raven, 1997). Этот параметр используется в качестве характеристики физиологического состояния фитопланктона и его фотосинтетической активности (Falkowski, Raven, 1997). Ранее нами была исследована динамика параметров флуоресценции после внесения добавок органического (мочевина, глицин) и минерального (нитраты, аммоний) азота в лимитированные по азоту культуры морских планктонных водорослей *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Thalassiosira weissflogii* и *Tetraselmis viridis*, акклиматизированных к лимитирующей и насыщающей фотосинтез освещенности (Ильяш и др., 2007). Показано, что за счет ассимиляции органического азота у водорослей происходит увеличение относительного выхода переменной флуоресценции, максимальной относительной скорости электронов по электронтранспортной цепи и величины насыщающей интенсивности света. Выявлены видоспецифичная зависимость динамики параметров флуоресценции от источника азота и освещенности (Ильяш и др., 2007).

В природных экосистемах концентрация  $N_{орг}$  изменяется значительно как во времени, так и в пространстве. Значимую долю в  $N_{орг}$  составляют вещества, которые планктонные водоросли способны ассимилировать. Например, в летний период доля азота мочевины в суммарном содержании  $N_{орг}$  может достигать 48%, а доля азота свободных аминокислот – более 25% (Flynn, Butler, 1986). В природных экосистемах фитопланктон в поверхностном слое испытывает стресс фотоингибирования, на промежуточных глубинах фотической зоны освещенность близка к насыщающему фотосинтез уровню, на нижней границе фотической зоны освещенность лимитирует фотосинтез. Различная обеспеченность фитопланктона световой энергией, а также зависимость скорости потребления водорослями мочевины и аминокислот от освещенности (Bonin et al., 1982; Wallen, Allan, 1987) выдвигают в качестве актуальных задач исследование динамики параметров флуоресценции у водорослей, ассимилирующих  $N_{орг}$  при разных уровнях освещенности. Особую актуальность такой подход приобретает в свете ежегодного возрастания количества поступающего в водные экосистемы органического азота антропогенного происхождения (Seitzinger, Sanders, 1999).

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ динамики параметров флуоресценции экспериментальных сообществ фитопланктона Белого моря при ассимиляции нитратов, аммония, глицина и мочевины при двух уровнях освещенности.

### Материалы и методы

Эксперименты проводили на Беломорской биологической станции Московского государственного университета (Карельский берег Кандалакшского залива Белого моря) с 23 августа по 10 сентября 2007 г. В позднелетний период фитопланктон Белого моря лимитирован недостатком азота (Максимова, 1991; Ильяш и др., 2003).

**Схема экспериментов.** Фитопланктон, служивший исходным материалом для экспериментов, отбирали с помощью сети из планктонного газа № 78 в слое 2–5 м. Для устранения прессы выедания растительным зоопланктоном фитопланктон пропускали через планктонный газ № 40. В 1.5 литровые пластиковые ёмкости добавляли отфильтрованную морскую воду, концентрированный фитопланктон (посевной титр – 1150 кл/мл, 2940 мкгС/л), а так же все биогенные элементы, за исключением азота, согласно прописи среды f/2 (Guillard, Ryther, 1962). Азот вносили в виде мочевины, глицина, нитратов или аммония в концентрации 180 мкмоль азота/л. Соотношение содержания азота и фосфора в среде равнялось пяти, что согласно общепринятым взглядам (Ryther, Dunstan, 1971), обуславливает ограничение развития водорослей недостатком азота. В качестве контроля использовали фитопланктон без добавок азота. Экспериментальные емкости экспонировали *in situ* на плотиках на глубине 1 м. Полуденная освещенность на этой глубине (E1) колебалась в пределах 25 – 1050 мкЕ/(м<sup>2</sup> сек). Более низкую освещенность (E2), составляющую в среднем 51 % от E1, создавали путём экранирования склянок тканью средней плотности.

Все варианты эксперимента проводили в трёх повторностях. При дальнейшем изложении сообщества, росшие с использованием разных источников азота, обозначены следующим образом: сообщество, ассимилирующее нитраты – N, глицин – G, мочевины – M, аммоний – A. Контрольное сообщество (без добавок азота) обозначено как K.

**Параметры флуоресценции** фитопланктона оценивали с использованием флуорометра WaterPAM (Walz, Германия) по методологии быстрых световых кривых (Rapid Light Curves, RLCs) (Schreiber et al., 1997; Ralph, Gademann 2005). Для каждого экспериментального сообщества параметры флуоресценции измеряли на одной подпробе при последовательном увеличении (от нуля) интенсивности света, генерируемого в флуорометре WaterPAM. Перед измерениями все подпробы выдерживали в темноте не менее 30 мин. Интенсивности освещения составляли 25, 52, 71, 98, 144, 208, 291 и 401 мкЕ/(м<sup>2</sup> с). Время освещения фитопланктона светом каждой интенсивности равнялось 30 секундам.

Квантовую эффективность фотосистемы 2 (ФС2) измеряли при насыщающей вспышке 5000 мкЕ/(м<sup>2</sup> с) продолжительностью 0,8 с, генерируемой флуорометром. Флуорометр регистрирует следующие показатели: F<sub>0</sub> и F<sub>m</sub> (у клеток, акклимизированных к темноте), F'<sub>m</sub> и F<sub>t</sub> (у клеток, подвергшихся освещению светом определенной интенсивности). На основе этих показателей флуорометром WaterPAM автоматически рассчитываются следующие параметры:

1) Максимальная квантовая эффективность ФС2  $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$ , где F<sub>0</sub> – минимальный выход флуоресценции, измеренный непосредственно перед насыщающей вспышкой.

2) Фотохимическая эффективность ФС2 клеток, освещаемых в течение 30 с светом определенной интенсивности  $\Phi_{\text{ФС2}}$ .  $\Phi_{\text{ФС2}} = (F'_m - F_t) / F'_m$  (Genty et al. 1989), где F<sub>t</sub> – выход флуоресценции при данной интенсивности света, измеренный непосредственно перед насыщающей вспышкой. Параметр  $\Phi_{\text{ФС2}}$  отражает долю световой энергии, используемой в фотохимических реакциях от световой энергии, поглощенной хлорофиллом ФС2.

3) Нефотохимическое тушение флуоресценции  $\text{NPQ} = (F_m - F'_m) / F'_m$ . Величина NPQ характеризует рассеивание световой энергии в виде тепла (Schreiber, 2004).

4) Относительная скорость нециклического электронного транспорта при определенной интенсивности света  $\text{rETR} = \Phi_{\text{ФС2}} \cdot 0,5 \cdot E_i$ , где E<sub>i</sub> – освещенность, мкЕ/(м<sup>2</sup> с). Принимается равное распределение световой энергии между ФС2 и ФС1 (Sakshaug et al., 1997).

Соотнесение каждой интенсивности света значения rETR дает так называемые быстрые световые кривые (Schreiber et al., 1997; Ralph, Gademann 2005), обозначаемые далее как P/E кривые. На основании полученных P/E кривых оценивали следующие фотосинтетические параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона P/E кривой,  $\alpha$ ) и максимальную относительную скорость электронов по электрон транспортной цепи (rETR<sub>max</sub>). Величину  $\alpha$  рассчитывали как коэффициент линейной регрессии, построенной по точкам, лежащим на светолимитированном участке P/E кривой, rETR<sub>max</sub> – как среднее по значениям rETR, находящимся на светонасыщающем участке (Jassby, Platt, 1976). Обозначения и определения фотосинтетических параметров приведены в соответствии с общепринятой номенклатурой (MacIntyre et al., 2002).

### Результаты и обсуждение

После внесения добавок азота во всех сообществах наблюдалось увеличение суммарной биомассы водорослей, превосходящее таковое в контроле. Увеличение биомассы продолжалось до 6 сут при E1 и до 9 сут при E2. Величина накопленной биомассы фитопланктона зависела от источника азота и уровня освещенности (Белевич, 2009).

По мере роста экспериментальных сообществ изменялись параметры флуоресценции водорослей, при этом динамика параметров флуоресценции зависела от источника азота и освещенности (табл.).

На стадии активного роста с первых по шестые сутки максимальная квантовая эффективность ФС2 ( $F_v/F_m$ ) изменялась в пределах 0,64 – 0,71. Такие величины свидетельствуют о хорошем физиологическом состоянии водорослей (Kromkamp et al., 1998) в экспериментальных сообществах, а также о том, что водоросли не лимитированы недостатком азота (Parkhill et al., 2001).

Сопоставление величин максимальной относительной скорости фотосинтетического транспорта электронов ( $rETR_{max}$ ) водорослей, ассимилирующих глицин, мочевины и нитраты при двух уровнях освещенности, дает картину аналогичную отмеченной для P/B (Белевич, 2009). В сообществах, росших с использованием аммония, в отличие от соотношения величин P/B,  $rETR_{max}$  было выше при E2, чем при E1 на протяжении всего периода увеличения биомассы.

Динамика коэффициента максимальной утилизации световой энергии  $\alpha$  практически не зависела от добавки азота. При всех добавках наибольшие значения  $\alpha$  достигались на третьи сутки роста как при E1, так и при E2. На 6 и 9 сутки при всех добавках значения  $\alpha$  в условиях освещенности при E2 были выше таковых при E1. Ранее отсутствие зависимости  $\alpha$  от источника (органический или минеральный) азота была показана для водоросли *Aureoumbra lagunensis*, относящейся к классу Pelagophyceae (Harris et al., 2007).

Таблица

**Динамика максимальной квантовой эффективности ФС2 ( $F_v/F_m$ ), максимальной относительной скорости фотосинтетического транспорта электронов ( $rETR_{max}$ ), коэффициента максимальной утилизации световой энергии ( $\alpha$ ), нефотохимического тушения при интенсивности света 401 мкЕ/(м<sup>2</sup> с) (NPQ) у водорослей, росших с добавками нитратов (N), мочевины (M), глицина (G) и аммония (A) при освещенности E1 и E2.**

| Сутки роста | Освещенность            |       |       |       |         |       |       |       |
|-------------|-------------------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
|             | E1                      |       |       |       | E2      |       |       |       |
|             | Добавки                 |       |       |       | Добавки |       |       |       |
|             | N                       | M     | G     | A     | N       | M     | G     | A     |
|             | $F_v/F_m$ , усл. ед.    |       |       |       |         |       |       |       |
| 1           | 0,69                    | 0,69  | 0,68  | 0,68  | 0,69    | 0,66  | 0,70  | 0,67  |
| 3           | 0,67                    | 0,66  | 0,70  | 0,67  | 0,71    | 0,67  | 0,70  | 0,69  |
| 6           | 0,64                    | 0,67  | 0,67  | 0,69  | 0,70    | 0,70  | 0,69  | 0,72  |
| 9           | 0,61                    | 0,57  | 0,55  | 0,61  | 0,66    | 0,65  | 0,68  | 0,66  |
|             | $rETR_{max}$ , усл. ед. |       |       |       |         |       |       |       |
| 1           | 29,9                    | 30,7  | 29,0  | 26,7  | 30,1    | 30,2  | 31,7  | 28,8  |
| 3           | 35,1                    | 32,2  | 31,5  | 32,2  | 28,5    | 37,7  | 34,5  | 33,0  |
| 6           | 20,4                    | 23,0  | 21,6  | 22,6  | 26,5    | 27,7  | 26,0  | 31,3  |
| 9           | 18,3                    | 17,5  | 12,0  | 16,0  | 26,4    | 29,2  | 26,7  | 29,0  |
|             | $\alpha$ , усл. ед.     |       |       |       |         |       |       |       |
| 1           | 0,200                   | 0,197 | 0,194 | 0,179 | 0,201   | 0,204 | 0,192 | 0,175 |
| 3           | 0,217                   | 0,222 | 0,218 | 0,213 | 0,217   | 0,228 | 0,212 | 0,215 |
| 6           | 0,184                   | 0,194 | 0,186 | 0,194 | 0,205   | 0,211 | 0,205 | 0,224 |
| 9           | 0,177                   | 0,156 | 0,131 | 0,158 | 0,203   | 0,203 | 0,200 | 0,194 |
|             | NPQ, усл. ед.           |       |       |       |         |       |       |       |
| 1           | 0,97                    | 0,81  | 0,80  | 1,13  | 0,82    | 0,74  | 1,04  | 0,92  |
| 3           | 0,61                    | 0,64  | 0,77  | 0,45  | 0,43    | 0,37  | 0,56  | 0,57  |
| 6           | 1,15                    | 1,01  | 1,43  | 0,92  | 0,94    | 0,89  | 0,82  | 0,82  |
| 9           | 1,02                    | 1,09  | 1,31  | 0,91  | 0,86    | 0,95  | 0,93  | 0,85  |

Динамика нефотохимического тушения (NPQ) зависела от ассимилируемого субстрата и уровня освещенности. Значения NPQ при увеличении интенсивности фотосинтетически активной радиации возрас-

тали более резко в сообществах G за исключением первых суток при E1 и шестых суток при E2. При всех добавках и обеих освещенностях с первых по третьей сутки значения NPQ снижались, а по мере достижения водорослями максимальных значений биомассы (на 6-е и 9-е сутки) снова возрастали. Это согласуется с выявленной ранее зависимостью NPQ от стадии роста водорослей (Arsalane et al., 1994).

В большинстве случаев значения NPQ у водорослей, росших при E1, были выше таковых при E2. Исключение составили сообщества G в 1-е сутки и A на 3-и сутки. В экспериментальных сообществах по числу видов и биомассе преобладали диатомовые водоросли (Белевич, 2009). У диатомовых водорослей основной компонентой NPQ является энергозависимое тушение ( $q_E$ ) в ксантофильном цикле (Casper-Lindley, Björkman, 1998). Электронный транспорт между двумя фотосистемами индуцирует градиент протонов через тилакоидную мембрану. Соответствующее подкисление лумена ведет к превращению диадинаксантина в диатоксантин, который рассеивает избыточную энергию в виде тепла (Casper-Lindley, Björkman, 1998; Lavaud et al., 2004). Амплитуда и кинетика NPQ у диатомей зависит от уровня освещенности, при котором растут водоросли (Lavaud et al., 2003) и выше у адаптированных к более высокой освещенности клеток (Perkins et al., 2006). Более высокие значения NPQ при E1, чем при E2 согласуются с тем, что в большинстве случаев максимальная относительная скорость фотосинтетического транспорта электронов отмечались при более низкой освещенности. Помимо зависимости от освещенности для диатомей показана видоспецифичность амплитуды и кинетики NPQ (Lavaud et al., 2004). Соответственно, видоспецифическая эффективность использования отдельными видами водорослей разных азотсодержащих субстратов (Fan et al., 2003), обуславливает зависимость NPQ сообществ от источника азота и освещенности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00932).

#### Литература

- Белевич Т.А., 2009. Продукционные характеристики фитопланктона Белого моря в зависимости от источника азота. Настоящий сборник.
- Ильяш Л.В., Житина Л.С., Федоров В.Д., 2003. Фитопланктон Белого моря. М.: Янус-К. 168 с.
- Ильяш Л.В., Белевич Т.А., Уланова А.Ю., Маторин Д.Н., 2007. Флуоресцентные параметры морских планктонных водорослей при ассимиляции органического азота // Вестник Московск. ун-та. Сер. 16, № 3. С. 17–22.
- Максимова М.П., 1991. Гидрохимия Белого моря // Гидрометеорология и гидрохимия морей СССР. Т.2. Белое море. Ч.1. С. 8–193.
- Antia N.J., Harrison J.P., Oliveira L., 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology // *Phycologia*. V. 30. P. 1–89.
- Arsalane W, Rousseau B, Duval J-C., 1994. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition // *Photochem. Photobiol.* V. 60. P. 237–243.
- Bonin D.J., Antia N.J., Pelaez-Hudlet J., 1982. Influence of temperature and light intensity on the utilization of glycine as nitrogen source for phototrophic growth of marine unicellular cyanophyte (*Cyanobacterium*) // *Bot. Mar.* V. 25. P. 493–499.
- Casper-Lindley C., Björkman O., 1998. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments // *Photosynth. Res.* V. 56. P. 277–289.
- Falkowski P.G., Raven J.A., 1997. Aquatic photosynthesis. Malden: Blackwell Science. 375 p.
- Fan C., Glibert P.M., Lomas M.W., 2003. Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum*, and *Thalassiosira weissflogii* // *Mar. Biol.* V. 142. P. 949–958.
- Flynn K.J., Butler I., 1986. Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* V. 34. P. 28–304.
- Genty B., Briantais J-M., Baker N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // *Biochim. Biophys. Acta.* V. 990. P. 87–92.
- Glibert P.M., 1988. Primary productivity and pelagic nitrogen cycling // Nitrogen cycling in coastal marine environments / Eds. T.H. Blackburn, J. Sorensen. N. Y. P. 3–31.
- Guillard R. R. L., Ryther J. H., 1962. Studies on marine diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // *Can. J. Microbiol.* V. 8. P. 229–239.
- Harris I. Muhlstein, Tracy A. Villareal, 2007. Organic and inorganic nutrient effects on growth rate-irradiance relationships in the Texas brown-tide alga *Aureocymbra lagunensis* (Pelagophyceae) // *J. Phycol.* V. 43 (6). P. 1223–1226.
- Jassby A.D., Platt T., 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* V. 21. P. 540–547.
- Kromkamp J., Barranguet C., Peene J., 1998. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* V.162. P. 45–55.

- Lavaud J., Rousseau B., Etienne A-L., 2003. Enrichment of the lightharvesting complex in diadinoxanthin and implications for the non-photochemical fluorescence quenching in diatoms // *Biochemistry*. V. 42. P. 5802–5808.
- Lavaud J., Rousseau B., Etienne A-L., 2004. General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae) // *J. Phycol.* V. 40. P. 130–137.
- MacIntyre H.L., Kana T., Anning T., Geider R., 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria // *J. Phycol.* V. 38. № 1. P. 17–38.
- Parkhill J-P., Maillet G., Cullen J.J., 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress // *J. Phycol.* V. 37. P. 517–529.
- Perkins R.G., Mouget J-L., Lefebvre S., Lavaud J., 2006. Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms // *Mar. Biol.* V. 149. P. 703–712.
- Ralph P.J., Gademann R., 2005. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity // *Aquat. Bot.* V. 82. P. 222–237.
- Ryther J., Dunstan W.M., 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment // *Science*. V. 171. P. 1008–1013.
- Sakshaug E., Bricaud A., Dandonneau Y., Falkowski P.G., Kiefer D.A., Legendre L., Morel A., Parslow J., Takahashi M., 1997. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results // *J. Plankton. Res.* V. 19. P. 1637–1670.
- Schreiber U., 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview // *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis* / Eds. G.C. Papageorgiou, Govindjee. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht The Netherlands. P. 279–319.
- Schreiber U., Gademann R., Ralph P.J., Larkum A.W.D., 1997. Assessment of photosynthetic performance of *Prochloron* in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements // *Plant Cell Physiol.* V. 38. P. 945–951.
- Seitzinger S.P., Sanders R.W., 1999. Atmospheric input of dissolved organic nitrogen stimulate estuarine bacteria and phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* V. 44. P. 721–736.
- Wallen D.G., Allan R., 1987. Utilization of amino acids by blue-green alga *Synechococcus* AN (*Anacystis nidulans*) // *Can. J. Botany.* V.65. P. 1133–1136.

## **FLUORESCENCE PARAMETERS OF THE WHITE SEA PHYTOPLANKTON IN DIFFERENT SOURCE OF NITRATE**

**T.A. Belevich, V.A. Osipov**

Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: 3438083@list.ru

Phytoplankton was sampled in the Kandalaksha Bay of the White Sea in the end of august, 2007. The samples were kept 14 days *in situ* under two levels of irradiance (E1>E2) with additions of nitrogen in form of urea (U), glycine (G), nitrate (N) and ammonium (A). using fluorometer WaterPAM The following fluorescence parameters were estimated every 3rd day: the maximum PSII efficiency (Fv/Fm), the maximum relative electron transport rate (rETRmax), coefficient of maximum photosynthetic efficiency ( $\alpha$ ) and non-photochemical quenching coefficient under light level 401 mE/m<sup>2</sup>s (NPQ). During the active growth period (from day 1 to day 6) Fv/Fm changed in range from 0,64 to 0,71. In A communities rETRmax was higher under E2, than under E1 during all period of biomass growth. The  $\alpha$  coefficient dynamics didn't show any dependence on the nitrogen additions. The NPQ dynamics depended on nitrogen source and irradiance level.

## **ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЩУК ТУНДРОВЫХ И ЛЕСОТУНДРОВЫХ ОЗЕР КОЛЬСКОГО ПОЛУОСТРОВА**

**Е.Г. Берестовский, И.А. Ерохина**

Учреждение Российской академии наук Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра РАН, г. Мурманск, Россия

e-mail: chiv1@front.ru

### **Введение**

Ареал щуки *Esox lucius* L. захватывает весь Кольский полуостров, однако в водоемах лесотундры и тундры Восточного Мурмана она распространена мозаично, причем центром расселения являются редкие водоемы с водной растительностью, пригодной для нерестового субстрата. Дан-