

Е. С. Соломонова

## ДИНАМИКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК ПИКО- И НАНОФИТОПЛАНКТОНА В ПРИБРЕЖНЫХ ВОДАХ ЧЕРНОГО МОРЯ

На основе данных регулярного (ежемесячного) мониторинга методом проточной цитометрии с использованием витального красителя флуоресцеина диацетата (FDA) как маркера внутриклеточной ферментативной активности исследована динамика численности и показателя жизнеспособности (ПЖ) пико- и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя в 2010 г. Направленных сезонных изменений доли физиологически активных клеток в составе исследуемых групп водорослей в прибрежных водах не выявлено. Отмечено, что в теплый период года и в период вегетативного развития водорослей в составе пико- и нанофитопланктона преобладают живые клетки, доля которых варьирует от 70 до 100 %. Низкие значения ПЖ (30 %) пикофракции, полученные на отдельных станциях в сентябре, октябре и декабре, возможно, связаны с присутствием в данной размерной группе клеток рода *Synechococcus*, которые очень чувствительны к колебаниям факторов среды. Библиогр. 28 назв. Ил. 7.

*Ключевые слова:* проточная цитометрия, пикофитопланктон, нанофитопланктон, показатель жизнеспособности, флуоресцеин диацетат.

*E. S. Solomonova*

### DYNAMICS OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE CELLS OF PICO- AND NANOPHYTOPLANKTON IN THE COASTAL WATERS OF BLACK SEA

A. O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Researches RAS,  
2, pr. Nakhimova, Sevastopol, 299011, Crimea, Russian Federation; solomonov83@mail.ru

The dynamics of the abundance and viability index (VI) of pico- and nanophytoplankton in the coastal waters of Black Sea near Sevastopol were investigated by regular monthly monitoring using flow cytometry and fluorescein diacetate vital dye (FDA), as a marker of intracellular enzyme activity. Directed seasonal changes in the fraction of physiologically active cells in the study groups of algae in coastal waters was not identified. It is noted that, in the warm season and during vegetative growth of algae in the composition and pico nano-phytoplankton predominate living cells, the percentage of which varies from 70 to 100 %. Low values of the VI (30 %) picophytoplankton were obtained at individual stations in September, October and December, possibly due to the presence of this kind of cell size group *Synechococcus*, which are very sensitive to fluctuations of environmental factors. Refs 28. Figs 7.

*Keywords:* flow cytometry, picophytoplankton, nanophytoplankton, vitality index, fluorescein diacetate.

## Введение

Для оценки потоков вещества и энергии в любой водной экосистеме исключительно важны данные о численности и жизнеспособности микроорганизмов, определяющих формирование значительной части первичной продукции, минерализацию органического вещества в столбе воды.

В гидробиологических исследованиях [1–3] наиболее часто используется показатель жизнеспособности (ПЖ), представляющий собой отношение числа живых клеток к общему числу клеток, содержащихся в исследуемом образце, и выражае-

---

Е. С. Соломонова (solomonov83@mail.ru): Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Российская Федерация, Крым, 299011, Севастополь, пр. Нахимова, 2.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

мый в процентах. При этом применение термина ПЖ к индивидуальным клеткам исключается. Нельзя также использовать это понятие для альтернативной характеристики — популяция жизнеспособная или популяция нежизнеспособная. Область применения ПЖ ограничивается популяциями бактерий, дрожжей и одноклеточных водорослей [4].

Наиболее часто для расчета фракции живых или мертвых клеток водорослей используется метод люминесцентного анализа в сине-фиолетовых лучах под микроскопом [5]. Однако данный метод продолжителен во времени, результаты не всегда хорошо обоснованы и плохо поддаются количественному анализу, главным образом из-за получаемого разнообразия гаммы световых переходов и яркости оттенков свечения у умирающих клеток.

Использование витальных красителей в сочетании с методом проточной цитометрии [6, 7] позволяет получить информацию о физиологическом состоянии клеток водорослей в экспресс-режиме, что делает этот метод удобным для определения ПЖ фитопланктонного сообщества и предоставляет возможность проводить необходимые исследования на большом количестве станций. FDA (флуоресцеин диацетат) — прижизненный краситель, широко применяемый в биологических исследованиях для оценки метаболизма клеток и целостности мембран. Показана возможность использования FDA для исследования жизнеспособности отдельных видов микроводорослей [8] и природных сообществ фитопланктона [9, 10].

Анализ ПЖ практически не проводился для сообществ черноморского фитопланктона. В литературе найдены данные лишь для отдельных видов водорослей [11, 12], в то время как ПЖ фитопланктона может служить индикатором не только его функционального состояния, но и качества среды обитания, а также одним из критериев оценки влияния биотических и абиотических факторов на фитопланктонное сообщество.

Цель работы состояла в определении сезонной динамики численности и показателя жизнеспособности пико- и нанопланктона в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя.

### Материал и методика

Работа выполнялась на базе отдела экологической физиологии водорослей и отдела планктона Института морских биологических исследований.

Пробы отбирали в поверхностном слое Черного моря ежемесячно с января по декабрь 2010 г. на трех станциях в Севастопольской (ст. 1) и Карантинной (ст. 2а и 2б) бухтах (рис. 1). Всего собрано и обработано более 120 проб. Первая станция, с более высокой антропогенной нагрузкой (район мидийной фермы), находилась в закрытой части бухты, остальные — в открытом побережье. Общая глубина станций составляла 14–19 м. В работе также использованы данные по температуре, полученные сотрудником отдела планктона в указанный период.

**Цитометрический анализ.** Для исследования динамики численности пико- (размер клеток 0,2–2 мкм) и нанопланктона (размер клеток 2–10 мкм) применяли проточный цитометр Cytomics<sup>TM</sup> FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованный 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программное обеспечение СХР. Исследовались только указанные размерные группы водорослей из-за невозмож-

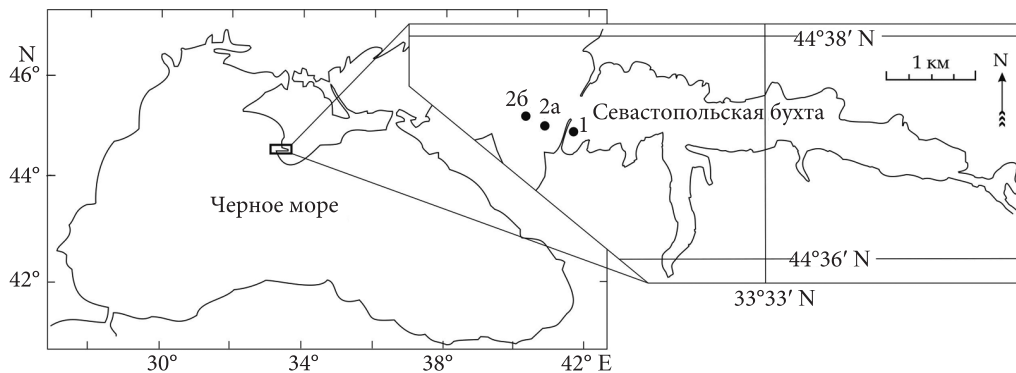


Рис. 1. Расположение станций в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя

ности проточного цитометра пропускать клетки размером свыше 30 мкм. Общую численность исследуемых групп микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяций клеток на двухпараметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции в красной области спектра (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах.

Численность физиологически активных клеток микроводорослей определяли в пробах, окрашенных флуорохромом FDA (Molecular Probes, США), с помощью гейтинга популяции клеток на двухпараметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции FDA (максимумы возбуждения и эмиссии, соответственно, 494 и 518 нм) в зеленой области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Для цитометрического анализа отбирали аликвоты объемом 3 мл в 3 повторностях.

Окраску пико- и нанопланктона флуорохромом FDA производили в соответствии с протоколом, описанным ранее для культур *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. № 3 [13], непосредственно после отбора проб.

На типичных цитограммах неокрашенных (рис. 2,а) и окрашенных FDA (рис. 2,б) проб воды видно, что кластеры точек С и Е соответствуют исследуемым

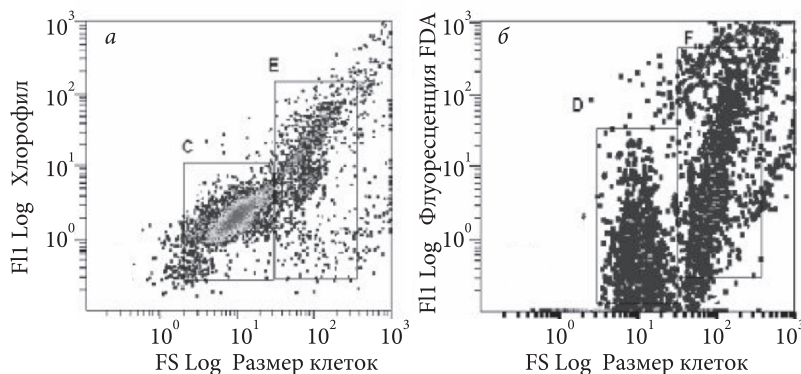


Рис. 2. Типичные цитограммы неокрашенных (а) и окрашенных FDA (б) проб фитопланктонного сообщества (С, Е и D, F — выделенные кластеры пико- и нанопланктона до и после окраски соответственно)

размерным группам пико- и нанофитопланктона до окраски флуоресцеин диацетатом, кластеры D, F — соответственно после окраски FDA.

Концентрацию клеток пико- и нанофитопланктона рассчитывали на основе данных о скорости протока пробы ( $60 \text{ мкл} \cdot \text{мин.}^{-1}$ ), времени счета (360 с) и количества клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени.

**Статистический анализ.** Статистическая обработка данных выполнялась с помощью стандартных программных пакетов Microsoft Exel 7.0, Statistica-5, Grapher-9, Sigma Plot для персонального компьютера. Рассчитывали средние арифметические и стандартные отклонения (SD) численности и доли физиологически активных клеток исследуемых размерных групп (минимум 3000 клеток для каждой пробы) по трем повторностям. Достоверность различий выборочных средних оценивали с помощью парного *t*-критерия ( $\alpha$ ) и коэффициентов корреляции (*R*). Для получения уравнений корреляции использовали линейный регрессионный анализ ( $P = 95\%$ ).

В данной работе показатель жизнеспособности (ПЖ) приравнивали к доле активных (живых) клеток в пробе.

### Результаты и обсуждение

В исследуемой акватории пики численности пикофитопланктона наблюдали в марте, апреле и ноябре, с абсолютным максимумом в марте — от  $30$  до  $40 \cdot 10^3 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$  (рис. 3). Минимальные значения численности ( $5\text{--}7 \cdot 10^3 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) зарегистрированы в зимний и осенний периоды, что, вероятно, обусловлено наиболее низкими в эти периоды значениями температуры и интенсивности света.

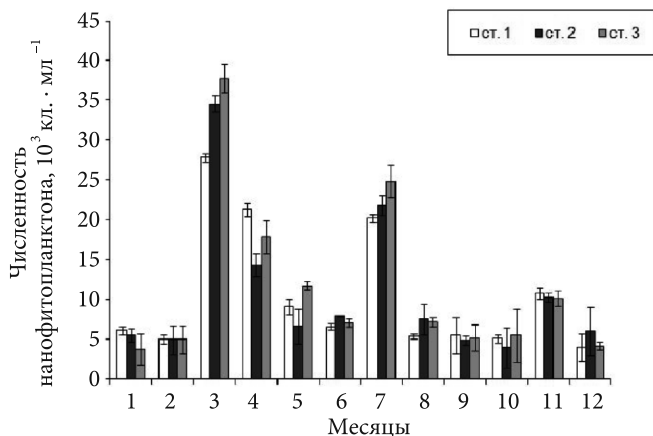


Рис. 3. Сезонные изменения численности пикофитопланктона в прибрежных поверхностных водах Черного моря

Доля живых клеток пиководорослей на протяжении года варьировала в диапазоне от 25 до 95% (рис. 4). Высокое содержание клеток с низкой метаболической активностью (60–70%) получено на всех трех станциях в сентябре, октябре и декабре. В весенний и летний периоды в составе пикопланктона преобладали физиологически активные (живые) клетки, процент которых в среднем для трех станций

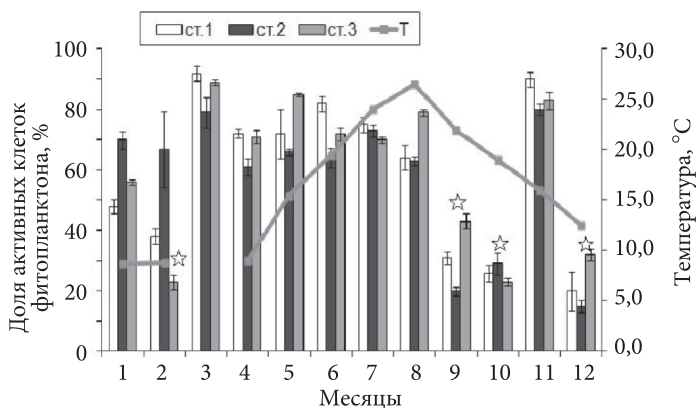


Рис. 4. Сезонная динамика доли физиологически активных (живых) клеток сообществ пикофитопланктона:

\* — статистически достоверные отличия ( $t$ -тест,  $p < 0,05$ ) минимального процента живых клеток от максимального (средние данные по трем станциям)

составил 80 %. Высокая доля живых клеток пикофракции в ноябре, вероятно, связана с изменениями гидрохимических показателей вод в связи с осенне-зимней конвекцией.

Максимальную численность нанофитопланктона (от 20 до  $30 \cdot 10^3$  кл.  $\cdot$  мл $^{-1}$ ) наблюдали в периоды летних и осенних «вспышек» развития водорослей — с июня по октябрь (рис. 5). В августе отмечалось снижение численности нанофитопланктона на всех трех станциях. Вероятно, это связано со сгонно-нагонными явлениями и флуктуациями содержания биогенных элементов в столбе воды [14, 15]. Не исключена и значительная роль пресса выедания фитофагами в регулировании численности микроводорослей [16]. Минимальные значения численности нанофитопланктона наблюдали в зимне-весенний период, что, вероятно, обусловлено низкими температурой (7–15°C против 17–24°C в теплые месяцы) и интенсивностью света (4–12 Э  $\cdot$  м $^{-2} \cdot$  сут $^{-1}$  против 15–40 Э  $\cdot$  м $^{-2} \cdot$  сут $^{-1}$  в теплые месяцы) [17].

Для нанопланктона относительно высокое содержание в пробе малоактивных клеток (50 %) наблюдалось лишь в феврале, независимо от места взятия проб. На протяжении остальной части года процент живых (активных) клеток нанопланктона оставался высоким (70–90 %) (рис. 6).

Близкие результаты сезонной динамики численности пико- и нанопланктона получены для Севастопольской бухты [18].

Сезонная вариабельность доли живых клеток пикопланктона (*Prochlorococcus* и *Synechococcus*) от 5 до 60 % выявлена в бухте Бланес [1], при этом определяющим фактором, по мнению авторов, была температура. Изменение содержания живых клеток цианобактерий в течение летнего периода наблюдали в Средиземном море [19]: оно увеличивалось от 35 % в начале июня до 100 % в августе, когда на фоне высокой скорости роста в популяции преобладали делящиеся клетки. На отсутствие сезонной динамики ПЖ указывают результаты работы [1], соотношение между

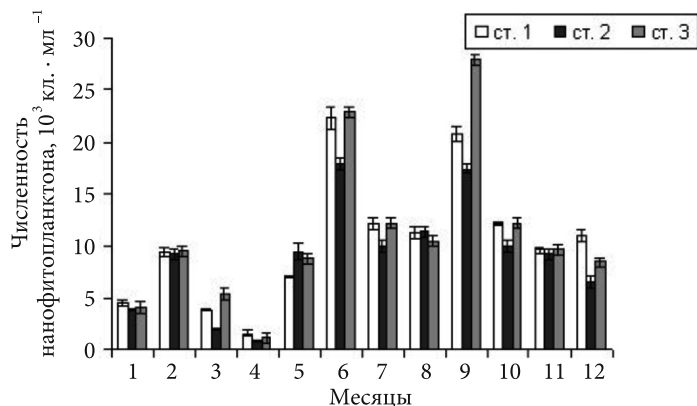


Рис. 5. Сезонные изменения численности нанофитопланктона в прибрежных поверхностных водах Черного моря

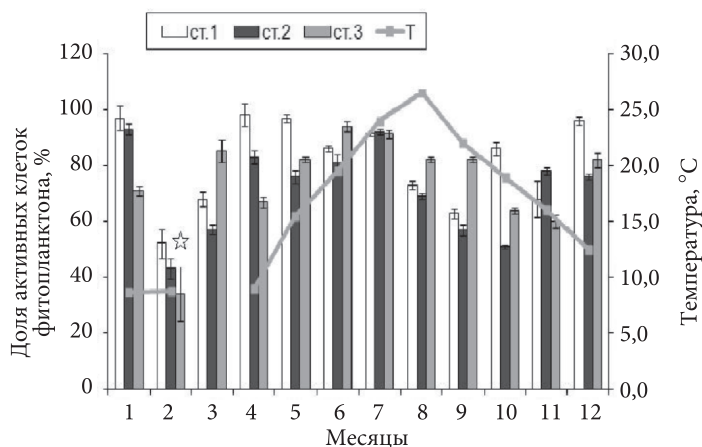


Рис. 6. Сезонная динамика доли физиологически активных (живых) клеток сообществ нанофитопланктона:

\* — статистически достоверные отличия ( $t$ -тест,  $p < 0,05$ ) минимального процента живых клеток от максимального (средние данные по трем станциям)

живыми и мертвыми клетками криптофитовых микроводорослей в Элхорн Слау мало зависело от сезона и составляло весной и зимой 60 % и 70 % соответственно.

Кроме того, имеются сведения, что ПЖ *Prochlorococcus SPP* и *Synechococcus SPP* связан с наличием питательных веществ в среде, он был ниже в олиготрофных водах по сравнению с ПЖ в регионах, подверженных влиянию экваториального апвеллинга в центральной части Атлантического океана [2, 20].

Вариабельность ПЖ водорослей может быть связана с видоспецифичностью доминирующих в момент отбора пробы видов [2, 21]. Так, увеличение жизнеспособности популяции может быть результатом адаптации и достигаться за счет

того, что некоторые группы микроводорослей способны избегать фотоингибирования при воздействии света высокой интенсивности [22, 23] или азотного голодания вследствие особенностей внутриклеточной ассимиляции соединений. У *Prochlorococcus marinus* наблюдается более значительное снижение жизнеспособности при воздействии на клетки водоросли света высокой интенсивности в условиях лимитирования роста биогенными элементами по сравнению с видом пикоэукариот *Ostreococcus* sp. strain RCC410 и нанопланктонной водорослью *Thalassiosira oceanica*, выращенными в тех же условиях [3].

Сложность идентификации мертвых клеток связана и с особенностями строения клеточных оболочек микроводорослей. При низкой температуре створки клеток водорослей разрушаются медленнее, чем при высокой [12, 24], т. е. процесс разрушения клеток и последующая дезинтеграция и растворение клеточных структур зависят от температуры. Возможно, более высокий уровень содержания мертвых и малоактивных клеток в холодные месяцы определялся и этим фактором. В теплый период года основу фитопланктона по численности могут составлять мелкие жгутиковые водоросли, мертвые клетки которых разрушаются мгновенно, поэтому идентифицировать мертвые клетки сложно. По этой же причине, по мнению С. В. Горюновой [25], мертвые клетки фитопланктона практически не встречаются в южных морях.

Средние значения численности и ПЖ исследуемых размерных групп, рассчитанные для отдельных станций, отличались незначительно. Если исходить из предположения, что в загрязненных водах смертность организмов высокая, можно было бы ожидать более высокой численности малоактивных и мертвых клеток на станции 1, которая принималась как условно грязная. Однако существенных отличий между станциями по рассматриваемому показателю не получено. Наблюдалось лишь увеличение доли малоактивных и мертвых клеток пикофракции фитопланктона в зимний период на станции 1. Отсутствие значимых отличий между исследованными станциями может быть объяснено на основе данных работы [26], в которой было показано, что активная динамика водных масс в районе мидийной фермы способствует выносу продуктов жизнедеятельности моллюсков за пределы мелиорируемой акватории, препятствуя их аккумуляции в толще воды.

Сопоставление данных о ПЖ с полученными ранее значениями потенциальной скорости деления исследуемых размерных групп [27] показывает, что при максимальных значениях последней ( $0,8-1 \text{ сут}^{-1}$ ) в составе популяций преобладают физиологически активные клетки (80–100%). На рисунке 7 приведены данные, иллюстрирующие связь средних значений потенциальной скорости роста пико- (рис. 7,а) и нанофракций (рис. 7,б) микроводорослей и доли активных клеток, полученные на трех исследуемых станциях.

Для нанопланктона данная зависимость выражена слабо, так как на протяжении всего периода исследований в пробах преобладали активные (живые) клетки.

Аналогичные результаты были получены М. И. Сеничевой [12] в Севастопольской бухте для черноморского вида *Skeletonema costatum*. В вегетационный период в популяции данной водоросли доминировали живые клетки, доля которых составляла 70–99%. В работе [28] также отмечено преобладание активных клеток эукариотического фитопланктона весной, когда отмечались максимальные значения скорости его роста.

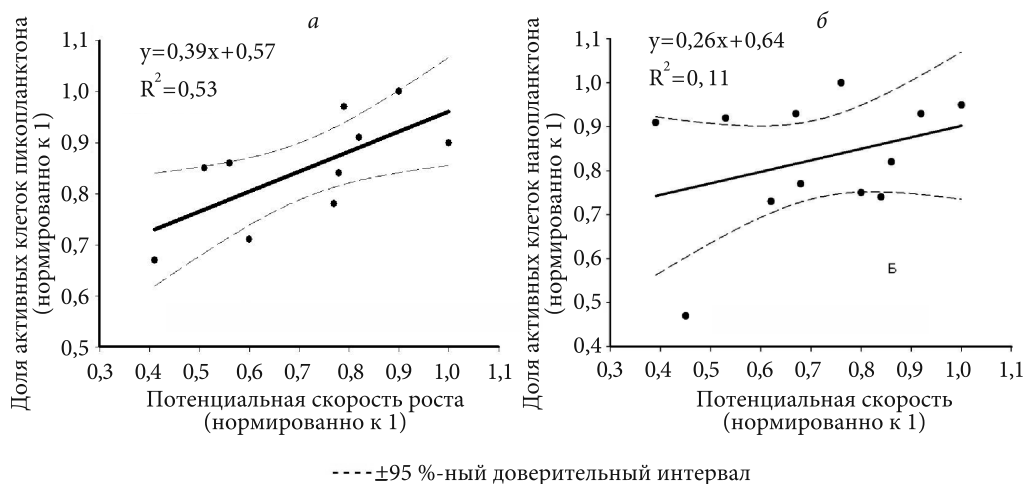


Рис. 7. Связь потенциальной скорости роста и доли активных клеток пико- (а) и нанопланктона (б)

### Заключение

Успешно апробирован в полевом исследовании сообществ черноморского пико- и нанопланктона метод прижизненной окраски клеток водорослей диацетатом флуоресцеина (ДФ).

В соответствии с результатами годовой съемки пико- и нанопланктона Карантинной бухты и сопредельных вод достоверных различий в процентном соотношении живых клеток в сообществах микроводорослей не выявлено. Более высокий уровень численности мертвых клеток пикофитопланктона получен в холодный период. Выдвинуты предположения, что, по крайней мере, одной из причин этого феномена могла быть низкая температура, которая приводит к замедлению скорости разложения мертвых клеток, или же низкие значения ПЖ, возможно, связаны с присутствием в данной размерной группе клеток рода *Synechococcus*, на жизнеспособность которых могут влиять даже незначительные колебания факторов среды. В теплый период года и в период вегетативного развития водорослей в составе пико- и нанопланктона преобладали живые клетки, доля которых варьировала от 70 до 100 %.

Автор выражает глубокую признательность В. С. Муханову (Институт морских биологических исследований) за неоценимую помощь при работе на проточном цитометре.

### Литература

1. Agustí S., Sánchez M. C. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe // *Limnol. Oceanogr.* 2002. Vol. 47. P. 818–828.
2. Alonso-Laita P., Agustí S. Contrasting patterns of phytoplankton viability in the subtropical NE Atlantic Ocean // *Aquatic microbial ecology.* 2006. Vol. 43. P. 67–78.



3. Kulk G., van de Poll W.H., Visser R.J., Buma A.G. Low nutrient availability reduces high-irradiance-induced viability loss in oceanic phytoplankton // *Limnol. Oceanogr.* 2013. Vol. 58. P. 1747–1760.
4. Луста К. А., Фихте Б. А. Методы диагностики живых клеток по их метаболической активности // Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / под ред. В. К. Ерошина. Пушчино: ОНТИ НЦИ АН СССР. 1990. С. 53–76.
5. Горюнова С. В. Применение метода флуоресцентной микроскопии для определения живых и мертвых клеток водорослей // *Вестн. АН СССР.* 1951. Т. 6. С. 100–102.
6. Jochet F. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate // *Mar. Biol.* 1999. Vol. 135. P. 721–728.
7. Stauber J.L., Franklin N.M., Adams M.S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae // *TRENDS in Biotechnology.* 2002. Vol. 20. P. 141–143.
8. Bentley-Mowat J.A. Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton // *Bot. Mar.* 1982. Vol. 28. P. 203–204.
9. Onji M., Sawabe T., Ezura Y. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton // *Bul. Fac. Fish Hokkaido Univ.* 2000. Vol. 51. P. 151–158.
10. Smith S.R. Flow cytometric analysis of phytoplankton viability in Elkhorn Slough, California. Master's Theses and Graduate Research. 2009.
11. Роухияйнен М. И. Состав поверхностного фитопланктона Севастопольской бухты по результатам люминесцентного анализа // *Экосистемы шельфовых зон.* 1988. С. 15–38.
12. Сеничева М. И. Динамика популяции *Skeletonema costatum* (Grev.) в Севастопольской бухте // *Экология моря.* 1980. Т. 1. С. 11–15.
13. Соломонова Е. С., Муханов В. С. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Rhaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. с помощью проточной цитометрии // *МЭЖ.* 2011. Т. 10. С. 67–72.
14. Стельмах Л. В., Бабич И. И., Ляшенко С. В. Сезонные изменения концентрации хлорофилла “а” и отношения органический углерод/хлорофилл “а” в фитопланктоне прибрежных вод Черного моря в районе Севастополя по результатам исследований в 2000–2001 гг. // *Экология моря.* 2002. Т. 61. С. 64–68.
15. Стельмах Л. В., Губанов В. И., Бабич И. И. Сезонные изменения скорости роста и лимитирование фитопланктона питательными веществами в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя // *Морск. экол. журн.* 2004. Т. 3, № 4. С. 55–73.
16. Чмыр В. Д. и др. Структурно-функциональные параметры планктона черноморского побережья // *Системы контроля окружающей среды.* 2007. Т. 13. С. 335–238.
17. Стельмах Л. В., Куфтаркова Е. А., Акимов И. А., Бабич И. И., Кожемяка А. Б. Использование переменной флуоресценции хлорофилла *in vivo* для оценки функционального состояния фитопланктона // *Система контроля окружающей среды.* 2010. Т. 13. С. 263–268.
18. Осадчая Т. С. Характеристика размерной структуры фитопланктона по измерениям хлорофилла “а” // *Экология моря.* 2007. Т. 73. С. 70–74.
19. Agawin N. S. R., Duarte C. M., Agustí S. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature // *Mar. Ecol. Progress Series.* 1998. Vol. 170. P. 45–53.
20. Labré s. M., Agustí S. Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities // *Limnol. Oceanogr.* 2006. Vol. 51. P. 21–29.
21. Agustí S. Viability and niche segregation of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells across the Central Atlantic Ocean // *Aquatic microbial ecology.* 2004. Vol. 36. P. 53–59.
22. Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // *Bioessays.* 2006. Vol. 28. P. 1091–1101.
23. Raven J. A., Giordano M., Beardall J., Maberly S. C. Algal and aquatic plant carbon concentrating mechanisms in relation to environmental change // *Photosynthesis Research.* 2011. Vol. 109. P. 281–296.
24. Kalf J., Knoechel R. Phytoplankton and their dynamics in oligotrophic and eutrophic lakes // *An. Review of Ecology and Systematics.* 1978. P. 475–495.
25. Горюнова С. В. Применение метода флуоресцентной микроскопии для определения живых и мертвых клеток водорослей // *Тр. Ин-та микробиол.* 1952. Т. 2. С. 64–57.
26. Куфтаркова Е. А., Ерёмин И. Ю., Субботин А. А. Тонкая вертикальная химическая структура вод в районе мидийной фермы (предпроливная часть Севастопольской бухты) // *МЭЖ.* 2011. Т. 10. С. 38–42.
27. Соломонова Е. С. Определение потенциальной скорости роста фитопланктона с использованием митотического индекса и проточной цитометрии // *Тезисы 7-й международной научно-прак-*

тической конференции молодых ученых «Понт Эвксинский — 2011» (Севастополь, 2011). Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. С. 220–222.

28. Hayakawa M., Suzuki K., Saito H., Takahashi K., Ito S. I. Differences in cell viabilities of phytoplankton between spring and late summer in the northwest Pacific Ocean // J. of Exper. Mar. Biol. and Ecol. 2008. Vol. 360, N 2. P. 63–70.

## References

1. Agustí S., Sánchez M. C. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe. *Limnol. Oceanogr.*, 2002, vol. 47, pp. 818–828.

2. Alonso-Laita P., Agustí S. Contrasting patterns of phytoplankton viability in the subtropical NE Atlantic Ocean. *Aquatic microbial ecology*, 2006, vol. 43, pp. 67–78.

3. Kulk G., van de Poll W. H., Visser R. J., Buma A. G. Low nutrient availability reduces high-irradiance-induced viability loss in oceanic phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 2013, vol. 58, pp. 1747–1760.

4. Lusta K. A., Fikhte B. A. Metody diagnostiki zhivyykh kletok po ikh metabolicheskoi aktivnosti [Methods of living cells diagnosis in their metabolic activity]. *Metody opredeleniia zhiznesposobnosti mikroorganizmov [Methods for determining of microorganisms viability]*. Ed. by V. K. Eroshin. Pushchino, ONTI NTsI AS USSR Publ., 1990, pp. 53–76. (In Russian)

5. Goriunova S. V. Primenenie metoda fluorestsentnoi mikroskopii dlia opredeleniia zhivyykh i mertvykh kletok vodoroslei [The application of fluorescence microscopy for determine the living and dead algae cells]. *Vestn. AN SSSR [Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR]*, 1951, vol. 6, pp. 100–102. (In Russian)

6. Jochem F. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. *Mar. Biol.*, 1999, vol. 135, pp. 721–728.

7. Stauber J. L., Franklin N. M., Adams M. S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *TRENDS in Biotechnology*, 2002, vol. 20, pp. 141–143.

8. Bentley-Mowat J. A. Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. *Bot. Mar.*, 1982, vol. 28, pp. 203–204.

9. Onji M., Sawabe T., Ezura Y. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. *Bul. Fac. Fish Hokkaido Univ.*, 2000, vol. 51, pp. 151–158.

10. Smith S. R. *Flow cytometric analysis of phytoplankton viability in Elkhorn Slough*. California. Master's Theses and Graduate Research, 2009.

11. Roukhiainen M. I. Sostav poverkhnostnogo fitoplanktona Sevastopol'skoi bukhty po rezul'tatam luminescentnogo analiza [The composition of surface phytoplankton in Sevastopol Bay by the results of luminescence]. *Ekosistemy shel'fovykh zon [Ecosystems offshore zones]*, 1988, pp. 15–38. (In Russian)

12. Senicheva M. I. Dinamika populatsii *Skeletonema costatum* (Grev.) v Sevastopol'skoi bukhte [Population dynamics of *Skeletonema costatum* (Grev.) in Sevastopol Bay]. *Ekologiya moria [Ecology of the sea]*, 1980, vol. 1, pp. 11–15. (In Russian)

13. Solomonova E. S., Mukhanov V. S. Otsenka doli fiziologicheskii aktivnykh kletok v nakopitel'nykh kul'turakh *Phaeodactylum tricorutum* i *Nitzschia* sp. s pomoshch'iu protochnoi tsitometrii [Flow cytometry for the assessment of physiological active cells in batch cultures of *Phaeodactylum tricorutum* and *Nitzschia* sp.]. *MEZh [Sea. Ecol. J.]*, 2011, vol. 10, pp. 67–72. (In Russian)

14. Stel'makh L. V., Babich I. I., Liashenko S. V. Sezonnnye izmeneniia kontsentratsii khlorofilla “a” i otnosheniia organicheskii uglerod/khlorofill “a” v fitoplanktone pribrezhnykh vod Chernogo moria v raione Sevastopolia po rezul'tatam issledovaniy v 2000–2001 gg. [Seasonal changes in the concentration of chlorophyll “a” and the ratio of organic carbon/chlorophyll “a” in the phytoplankton in coastal waters of the Black Sea near Sevastopol on the results of research in 2000–2001]. *Ekologiya moria [Sea. Ecol. J.]*, 2002, vol. 61, pp. 64–68. (In Russian)

15. Stel'makh L. V., Gubanov V. I., Babich I. I. Sezonnnye izmeneniia skorosti rosta i limitirovanie fitoplanktona pitatel'nyimi veshchestvami v pribrezhnykh vodakh Chernogo moria v raione Sevastopolia [Seasonal changes in the growth rate and nutrient limitation of phytoplankton in the coastal waters of the Black Sea near Sevastopol]. *Morsk. ekol. zhurn. [Sea. Ecol. J.]*, 2004, vol. 3, no. 4, pp. 55–73. (In Russian)

16. Chmyr V. D. et al. Strukturno-funktsional'nye parametry planktona chernomorskogo pribrezh'ia [Structural and functional parameters of the coasts of the Black Sea plankton]. *Sistemy kontrolya okruzhaiushchei sredy [Environmental control systems]*, 2007, vol. 13, pp. 335–238. (In Russian)

17. Stel'makh L. V., Kufarkova E. A., Akimov I. A., Babich I. I., Kozhemiaka A. B. Ispol'zovanie peremennoi fluorestsentsii khlorofilla in vivo dlia otsenki funktsional'nogo sostoianiia fitoplanktona [The

use of variable chlorophyll fluorescence in vivo to evaluate the functional state of phytoplankton]. *Sistema kontroliia okruzhaiushchei sredy* [Environmental control systems], 2010, vol. 13, pp. 263–268. (In Russian)

18. Osadchaia T.S. Kharakteristika razmernoi struktury fitoplanktona po izmereniiam khlorofilla “a” [Characteristics of phytoplankton size structure by measuring chlorophyll “a”]. *Ekologiya moria* [Ecology of the sea], 2007, vol. 73, pp. 70–74. (In Russian)

19. Agawin N.S.R., Duarte C.M., Agusti S. Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. *Mar. Ecol. Progress Series*, 1998, vol. 170, pp. 45–53.

20. Labré s. M., Agustí S. Picophytoplankton cell death induced by UV radiation: Evidence for oceanic Atlantic communities. *Limnol. Oceanogr.*, 2006, vol. 51, pp. 21–29.

21. Agustí S. Viability and niche segregation of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* cells across the Central Atlantic Ocean. *Aquatic microbial ecology*, 2004, vol. 36, pp. 53–59.

22. Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 2006, vol. 28, pp. 1091–1101.

23. Raven J.A., Giordano M., Beardall J., Maberly S.C. Algal and aquatic plant carbon concentrating mechanisms in relation to environmental change. *Photosynthesis Research*, 2011, vol. 109, pp. 281–296.

24. Kalf J., Knoechel R. Phytoplankton and their dynamics in oligotrophic and eutrophic lakes. *An. Review of Ecology and Systematics*, 1978, pp. 475–495.

25. Goriunova S.V. Primenenie metoda fluorestsentnoi mikroskopii dlia opredeleniia zhivykh i mertvykh kletok vodoroslei [Application of fluorescence microscopy to determine the living and the dead algae cells]. *Tr. In-ta mikrobiol.* [Proceedings of the Institute of Microbiology], 1952, vol. 2, pp. 64–57. (In Russian)

26. Kuftarkova E.A., Eremin I.Iu., Subbotin A.A. Tonkaia vertikal'naia khimicheskaiia struktura vod v raione midiinnoi fermy (predprolivnaia chast' Sevastopol'skoi bukhty) [Thin vertical chemical structure of water in the area mussel farm (Sevastopol Bay)]. *MEZh* [Sea. Ecol. J.], 2011, vol. 10, pp. 38–42. (In Russian)

27. Solomonova E.S. Opredelenie potentsial'noi skorosti rosta fitoplanktona s ispol'zovaniem mitoticheskogo indeksa i protochnoi tsitometrii [Determination of the potential growth rate of phytoplankton using the mitotic index and flow cytometry]. *Tezisy 7-i mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh “Pont Evksinskii — 2011”* (Sevastopol', 2011) [Abstracts of 7th International Scientific and Practical Conference of Young Scientists “Pontus Euxine — 2011” (Sevastopol, 2011)]. Sevastopol', EKOSI-Gidrofizika Publ., 2011, pp. 220–222. (In Russian)

28. Hayakawa M., Suzuki K., Saito H., Takahashi K., Ito S. I. Differences in cell viabilities of phytoplankton between spring and late summer in the northwest Pacific Ocean. *J. of Exper. Mar. Biol. and Ecol.*, 2008, vol. 360, no. 2, pp. 63–70.

Статья поступила в редакцию 27 октября 2015 г., принята 13 января 2016 г.

Сведения об авторах:

Соломонова Екатерина Сергеевна — младший научный сотрудник

Solomonova Ekaterina S. — Researcher