

ЦИТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ СКОРОСТИ РОСТА ФИТОПЛАНКТОНА ПО МИТОТИЧЕСКОМУ ИНДЕКСУ

Методами проточной цитометрии исследовано влияние интенсивности света и цикла свет–темнота (12 : 12) на процент клеток с диплоидным набором ДНК в моновидовых культурах микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin *Nitzschia* sp. 3, *Prorocentrum pusillum* Schiller, *P. cordatum* (Ostf.) Dodge, *Isochrysis galbana* Parke. Показано, что доля клеток в фазе G2 достоверно выше при высокой интенсивности освещения. Для всех исследуемых видов получена хорошо выраженная корреляция ($r^2 > 0,98$) между потенциальной скоростью роста микроводорослей, определяемой по митотическому индексу, и их удельной продукцией, измеряемой по приросту численности. Показана возможность применения метода проточной цитометрии для анализа клеточного цикла и оценки потенциальных скоростей роста пико- и нанофитопланктона Чёрного моря. На трех станциях в Севастопольской и Карантинной бухтах потенциальная скорость роста пико- и нанофитопланктона в поверхностном слое составляла 0,2–1,0 сут⁻¹ (круглогодичная съёмка в 2010 г. на трех станциях, количество проб – 120). Максимумы этого показателя соответствовали годовым пикам численности сообществ.

Ключевые слова: проточная цитометрия, микроводоросли, фитопланктон, митотический индекс, скорость роста, SYBR Green I.

Введение

Данные о скорости роста микроводорослей имеют важное значение для анализа функционального состояния сообщества фитопланктона, его реакции на изменения условий окружающей среды, оценки потока энергии и вещества через сообщество и, наконец, понимания роли фитопланктона в пелагической пищевой цепи и морской экосистеме в целом. В гидробиологических исследованиях применяют ряд методов оценки удельной скорости роста фитопланктона (Стельмах и др., 2004). Одним из них является определение митотического индекса микроводорослей (McDuff, Chisholm, 1982; Carpenter, Chang, 1988). Митотический индекс позволяет судить о потенциальной скорости роста микроводорослей без учета потери клеток вследствие их физиологической смерти и лизиса (Garcés, Masó, 2001). Концептуальной основой

© Е.С. Соломонова, В.С. Муханов, 2015

метода являются закономерные изменения во внутриклеточном содержании ДНК при последовательном прохождении эукариотическими клетками фаз митотического цикла – G1 (подготовки к делению), S (синтеза ДНК), G2 (удвоения ДНК) и M (собственно, митоза) (McDuff, Chisholm, 1982).

Применение метода сопряжено с рядом трудностей, одна из которых – достоверность и точность определения M-фазы, т.е. самого митотического индекса. Использование современных технологий, а именно проточной цитометрии, и большого разнообразия маркеров внутриклеточного содержания ДНК позволяет определить потенциальную скорость роста фитопланктона по митотическому индексу с погрешностью менее 10 % (Marie et al., 1997). Вместе с тем, автоматизация цитометрических исследований выдвигает более высокие требования к подготовке проб, условиям окраски и проведению измерений. Существуют методологические сложности также в применении метода в полевых исследованиях из-за сложной и изменчивой структуры природного сообщества фитопланктона.

Поэтому целью данного исследования было определение митотического индекса для культур, выращенных при различных световых режимах; сопоставление результатов расчета удельной скорости роста по митотическому индексу и приросту численности клеток; определение потенциальной скорости роста пико- и нанофракции фитопланктонного сообщества.

Материалы и методы

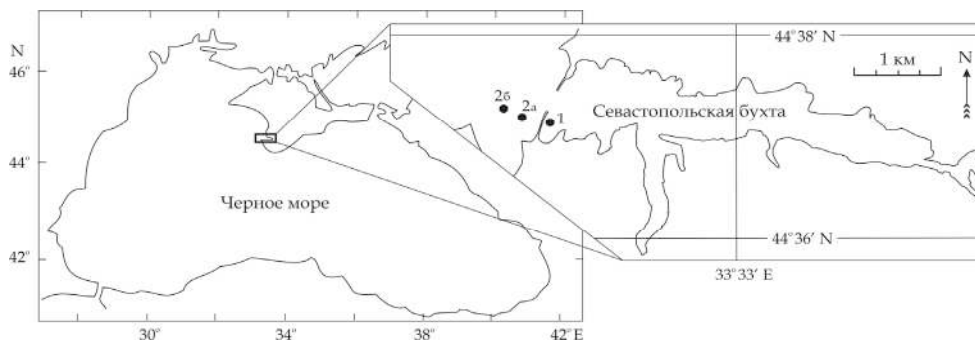
Моновидовые неаксеничные культуры водорослей *Phaeodactylum tricorutum*, *Nitzschia* sp. 3, *Prorocentrum pusillum*, *P. cordatum*, *Isochrysis galbana* из коллекции отдела экологической физиологии водорослей Ин-та биологии южных морей (Севастополь) выращивали на среде f/2 при постоянном освещении с адаптацией к двум интенсивностям света (низкой – режим LL и высокой – режим HL) и при естественном освещении день–ночь (режим 12 : 12 ч) (табл. 1). Уровень освещения измеряли люксметром Ю-116, принимая 1 клк = 17,2 мкЕ м⁻² · с⁻¹ (Парсонс и др., 1982). В режиме 12 : 12 максимальная интенсивность освещения в полдень составляла 30 мкЕ м⁻² · с⁻¹. Для определения содержания ДНК в клетках микроводорослей из культивационных сосудов отбирали пробы объёмом 1 мл, окрашивали флуорохромом SYBR Green I и осуществляли цитометрический анализ. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Пробы фитопланктона отбирали в поверхностном слое ежемесячно с января по декабрь 2010 г. на трех станциях в Севастопольской (ст. 1) и Карантинной (ст. 2а и 2б) бухтах (см. карту-схему). Цитометрический анализ природных проб фитопланктона осуществляли непосредственно после их отбора.

Таблица 1

Условия выращивания накопительных культур (LL – режим низкой и высокой (HL) интенсивности света)

Культура	T, °C	Освещённость, мкЕ м ⁻² ·с ⁻¹
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19	103,2 (HL) 17,2 (LL)
<i>Nitzschia</i> sp. 3	21	17,2 (LL) 206,4 (HL)
<i>Prorocentrum pusillum</i>	21	17,2 (LL) 206,2 (HL)
<i>P. cordatum</i>	20	17,2 (LL) 206,4 (HL)
<i>Isochrysis galbana</i>	20	17,2 (LL) 206,4 (HL)



Расположение станций в прибрежных водах Чёрного моря в районе Севастополя

Цитометрический анализ. Неокрашенные и окрашенные пробы культур микроводорослей и природного фитопланктона исследовали при помощи проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения СХР. Внутриклеточное содержание ДНК в клетках микроводорослей определяли после их окраски флуорохромом SYBR Green I (Molecular Probes, США) (Marie et al., 1997) с максимумами возбуждения и эмиссии, соответственно, 497 и 521 нм. Рабочий раствор красителя в разбавлении 10⁻² хранили в замороженном состоянии при -20 °C. Конечное разбавление в пробе составляло 10⁻⁴. Окрашивали в темноте в течение 20 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями. Численность клеток с одинарным и двойным наборами ДНК определяли на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах.

Численность микроводорослей определяли в неокрашенных пробах по автофлуоресценции пигментов в кластере на 2-параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и по флуоресценции отдельных клеток в красной области спектра (FL4) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток рассчитывали по скорости потока пробы ($60 \text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$), времени ($100\text{--}360 \text{ с}$) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (минимум 3000 кл. для каждой из проб). Качество измерений контролировали с помощью калибровочных флуоросфер (Flow-Check™, Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Расчёт удельной скорости роста. Потенциальную скорость роста ($\mu_{\text{ми}}$, ч^{-1}) культур микроводорослей и природного пико- и нанофитопланктона определяли по митотическому индексу, используя формулу, приведенную в литературе (McDuff, Chisholm, 1982):

$$\mu_{\text{ми}} = \sum_{i=1}^n \ln(M_{\text{max}} + 1),$$

где M_{max} – максимальная доля делящихся клеток, которую рассчитывали по формуле:

$$M_{\text{max}} = \frac{b}{(a+b)},$$

где b – доля делящихся клеток, $a + b$ – сумма делящихся и поделившихся клеток (определенная на проточном цитометре).

Потенциальную скорость роста микроводорослей $\mu_{\text{ми}}$ сравнивали с их удельной скоростью роста μ (или «удельной продукцией»), которую определяли по изменению численности микроводорослей по формуле:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t},$$

где N и N_0 – конечная и начальная численности клеток, t – время между измерениями, сут.

Результаты и обсуждение

Цитометрическое определение фаз клеточного цикла микроводорослей после их окраски флуорохромом SYBR Green I показано на рис. 1. Пик клеток в фазе G_1 расположен левее пика клеток в фазе G_2 , обычно выше его (т.е. G_1 -клетки доминируют по численности) и отделен от G_2 областью клеток в фазе S, численность которых низка. В световом режиме 12 : 12 доля клеток с двойным набором ДНК составляла от 6 (*P. cordatum*) до 23 % (*Ph. tricornutum*). В режиме LL наибольший процент клеток (37 %) с двойным набором ДНК отмечен у *Nitzschia* sp. 3, в остальных культурах он составлял 19–20 %. При высокой освещенности (HL) доля клеток в фазе G_2 была выше, чем при низкой (LL) и варьировала от 20 до 30 %, за исключением *Nitzschia* sp. 3 (38 %) (рис. 2). Таким образом, с увеличением интенсивности света доля клеток в фазе G_2 увеличивается.

Рост численности микроводорослей наблюдали во всех световых режимах, однако более выраженным он был при высокой интенсивности освещения (рис. 3). Соответственно, и скорости роста μ и $\mu_{ми}$ в этом световом режиме были достоверно выше ($p < 0,05$, парный t -тест), чем в режиме LL (табл. 2).

Соотношение μ и $\mu_{ми}$ представлено на рис. 4. Митотический индекс давал несколько заниженные значения скорости роста по отношению к удельной продукции, но разница между μ и $\mu_{ми}$ была статистически достоверна только при низкой интенсивности света LL ($p = 0,047$, парный t -тест). Наилучшее соотношение μ и $\mu_{ми}$ получено для светового режима HL (коэффициент в уравнении 1,15; коэффициент детерминации $r^2 = 0,99$).

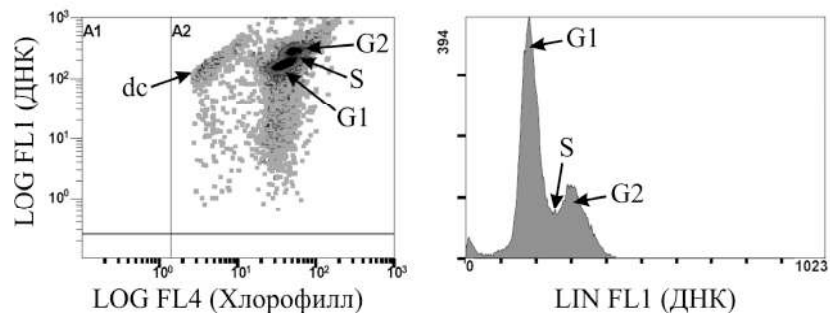


Рис. 1. Типичные цитогаммы окрашенных SYBR Green I проб культуры *Nitzschia* sp. 3 (справа) и фазы клеточного цикла

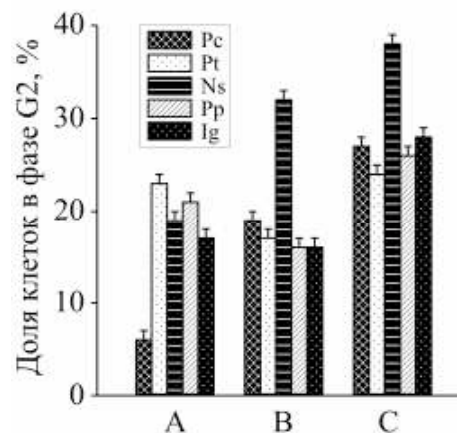


Рис. 2. Изменение доли клеток в фазе G_2 при цикле свет–темнота (12 : 12) (А), при низкой (В) и высокой (С) интенсивностях света. Pc – *Prorocentrum cordatum*, Pt – *Prorocentrum pusillum*, Ns – *Nitzschia* sp., Pp – *Prorocentrum pusillum*, Ig – *Isochrysis galbana*

Таблица 2

Удельная продукция (μ) и потенциальная скорость роста ($\mu_{\text{ми}}$) микроводорослей при их культивировании в разных световых условиях

Культура	μ , сут ⁻¹		$\mu_{\text{ми}}$, сут ⁻¹	
	HL	LL	HL	LL
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0,48	0,53	0,46	0,37
<i>Isochrysis galbana</i>	0,66	0,31	0,6	0,29
<i>Prorocentrum pusillum</i>	0,52	0,3	0,5	0,32
<i>Nitzschia</i> sp.	0,85	0,80	0,61	0,58
<i>Prorocentrum cordatum</i>	0,66	0,41	0,61	0,31

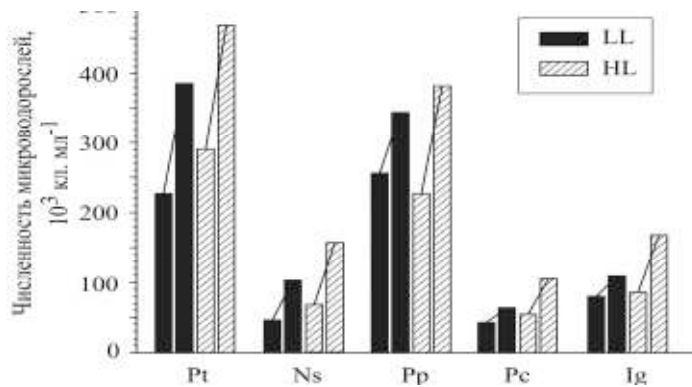


Рис. 3. Динамика численности микроводорослей в первые сутки эксперимента при низком (LL) и высоком (HL) уровнях освещенности. Pc – *Prorocentrum cordatum*, Pt – *Phaeodactylum tricornutum*, Ns – *Nitzschia* sp., Pp – *Prorocentrum pusillum*, Ig – *Isochrysis galbana*

В исследуемой акватории пики численности пикофитопланктона отмечали в марте, июле и ноябре, с абсолютным максимумом в марте – от 30 до 40 · 10³ кл.·мл⁻¹ (рис. 5). Весенний пик сопровождался высокой скоростью деления пикофитопланктона (0,9 сут⁻¹) и был, по-видимому, обусловлен высоким содержанием неорганических соединений азота (макс. значение 3,71 мкМ, ср. содержание 1,28 мкМ за весну) и фосфора (макс. значение 0,55 мкМ, ср. содержание 0,27 мкМ за весну) (Стельмах и др., 2010). Минимальные значения численности получены в зимний период (5–7 · 10³ кл. мл⁻¹), когда скорость роста не превышала 0,3 сут⁻¹, а концентрации нитратов и фосфатов были низкими (нитраты 0,1 мкМ, фосфаты 0,09 мкМ) (рис. 6) (Стельмах и др., 2010).

Рис. 4. Потенциальная скорость роста, рассчитанная по митотическому индексу и приросту численности клеток для высокой (\diamond) и низкой интенсивности света (\blacklozenge)

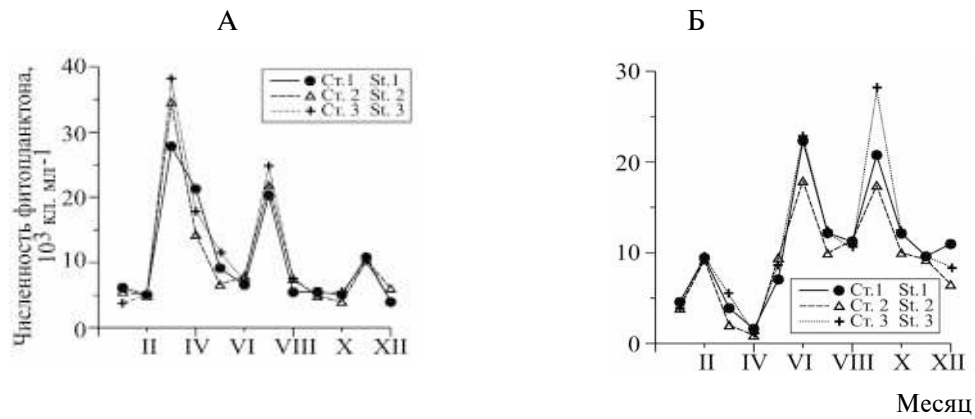
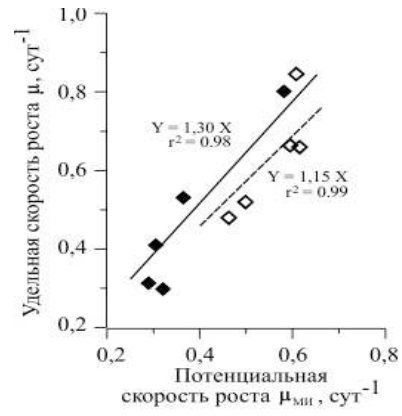


Рис. 5. Сезонные изменения численности пико- (А) и нанофракции (Б) фитопланктона в прибрежных поверхностных водах Черного моря

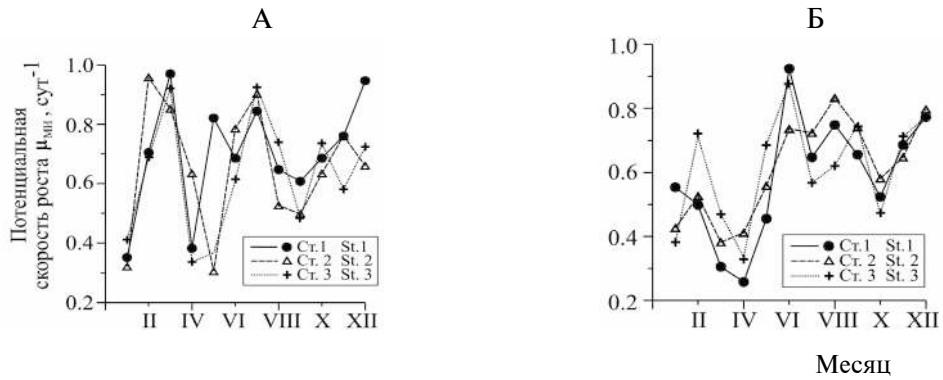


Рис. 6. Сезонные изменения потенциальной скорости роста пико- (А) и нанофитопланктона (Б) в прибрежных поверхностных водах Черного моря

Максимальную численность нанофитопланктона наблюдали в период летних и осенних "вспышек" развития сообщества — с июня по октябрь. Летом нанофракция доминировала по численности и, следовательно, по биомассе (см. рис. 5). В это время удельная скорость роста водорослей составляла 0,7–0,9 сут⁻¹. В августе при относительно высоких скоростях размножения нанофитопланктона (0,6–0,9 сут⁻¹) наблюдалось снижение его численности на всех трех станциях. Вероятно, это связано со сгонно-нагонными явлениями и флуктуациями содержания биогенов в воде. Не исключена и значительная роль выедания фитофагами в регулировании численности микроводорослей.

Минимальные значения численности и удельной скорости роста нанофитопланктона отмечены в зимне-осенний период. Низкая скорость роста водорослей (0,1–0,5 сут⁻¹), по-видимому, обусловлена низкими температурами (7–15 °С) и интенсивностью света (4–12 Э·м⁻²·сут⁻¹) по сравнению с таковыми (17–24 °С, 15–40 Э·м⁻²·сут⁻¹) в тёплые месяцы (Стельмах и др., 2010).

Свет, температура и содержание биогенных элементов в среде — основные факторы, регулирующие клеточный цикл микроводорослей (Olson et al., 1986; Vaulot, Chisholm, 1987; Carpenter, Chang, 1988). Но первостепенное значение имеет интенсивность света. В зависимости от уровня освещенности и вида водорослей может изменяться продолжительность G1 фазы и фазы синтеза и удвоения ДНК в клетках. Данная гипотеза получила теоретическое и экспериментальное подтверждения для многих видов фитопланктона (McDuff, Chisholm, 1982; Carpenter, Chang, 1988; Jochem, Meyerdierks, 1999). В наших исследованиях мы показали влияние светового режима на процент клеток, находящихся в стадии деления. В режиме HL во всех исследуемых культурах получен более высокий процент клеток с двойным набором ДНК, что соответствует основным положениям упомянутой гипотезы.

В работе (Jacquet et al., 2001a) было отмечено, что увеличение флюоресценции хлорофилла *a* и клеток, находящихся в фазах G2 и S, происходит в дневной период при цикле свет–темнота и при постоянном интенсивном свете. В эксперименте с *Prochlorococcus* sp. при смене режима LL на HL наблюдалось быстрое увеличение доли клеток с двойным набором ДНК и, как следствие, увеличение скорости деления клеток. Обратный эффект отмечен в темное время и когда культура была переведена с HL на LL режим. Увеличение доли клеток, находящихся в фазах синтеза и удвоения ДНК, в результате повышения интенсивности света наблюдали в поверхностных водах Средиземного моря (Jacquet et al., 1998).

Уровень освещенности влияет на скорость роста фитопланктона и фазу клеточного цикла и зависит от синхронности или асинхронности деления клеток. В асинхронных популяциях ограниченный уровень освещенности приводит к увеличению продолжительности фазы G1 (Olson, Chishokm, 1986), тогда как в синхронно делящихся популяциях

уменьшение интенсивности света вызывает увеличение времени клеточного цикла за счет расширения S и G2 фаз. В ряде работ было показано, что при сдвиге цикла свет–темнота или в условиях полной темноты происходит одновременный сдвиг в сроках вступления клеток в фазу синтеза ДНК (Jasquent et al., 2001b; Massie et al., 2010).

Нами получена хорошо выраженная корреляция между потенциальной скоростью роста микроводорослей, измеряемой по митотическому индексу, и скоростью роста фитопланктона, измеряемой по его приросту (см. рис. 4) для всех исследуемых видов. Аналогичные результаты были получены ранее и для других культур водорослей (Olson, 1986; Antia et al., 1990; Pan, Cembella, 1998; Peperzak et al., 1998; Jochem, Meyerdierks, 1999).

В период наших исследований потенциальная скорость роста пико- и нанофитопланктона изменялась, соответственно, от 0,3 до 1,0 сут⁻¹ и от 0,2 до 1,0 сут⁻¹ (см. рис. 6). Максимумы этого показателя, демонстрируемые как пико-, так и нанофитопланктоном соответствовали годовым пикам численности этих сообществ. И наоборот, минимальную потенциальную скорость роста (от 0,2 до 0,3 сут⁻¹) наблюдали в феврале и апреле, когда численность обеих размерных групп была низкой. Подобная связь между кинетикой роста и численностью планктонных микроводорослей была выявлена в работе Е. Гарсес и др. (Garcés et al., 1999), которые показали, что «цветение» микроводоросли *Gyrodinium corsicum* сопровождается максимальной скоростью роста, а развитие этого вида в последующие месяцы характеризуется средними значениями данного показателя. Согласно нашим исследованиям, скорость роста мелкого фитопланктона зависит от его численности (см. рис. 7), однако связь эта выражена слабо, особенно в пикофракции (коэффициент детерминации $r^2 = 0,15$).

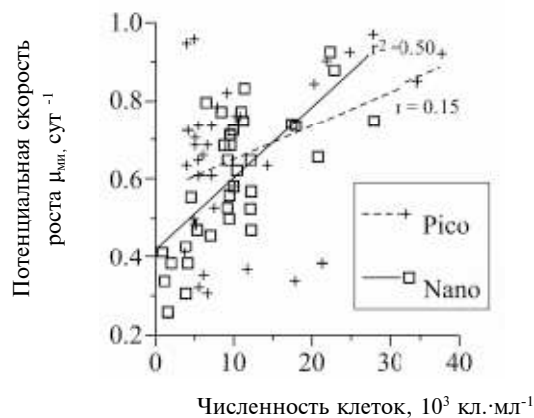


Рис. 7. Зависимость удельной скорости роста от численности пико- и нанофракции фитопланктона

Для определения клеточного цикла фитопланктона мы использовали флуорохром SYBR Green I, который успешно применяется для количественного определения бактериопланктона и анализа клеточного цикла пикофитопланктона (Marie, 1997) или отдельных видов водорослей (Olson et al., 1986; Peperzak et al., 1998). Необходимости в проведении таксономического анализа отобранных нами проб фитопланктона не было, поскольку цитограммы позволяли по внутриклеточному содержанию пигментов выделить хорошо обособленные кластеры клеток для проведения точного и достоверного клеточного анализа. Для каждого из кластеров мы получали характерные диаграммы распределения содержания ДНК в клетках, которые позволяли выделить соответствующие фазы клеточного цикла и, таким образом, рассчитать потенциальные скорости роста популяций клеток по митотическому индексу. Подобный подход эффективен в исследованиях океанического пикофитопланктона, в котором доминируют цианобактерии *Prochlorococcus* sp. и *Synechococcus* sp. (Olson et al., 1986; Pan, Cembella, 1998; Jacquet et al., 2001b), но, как показали наши исследования, может успешно применяться и в исследованиях цианобактериального населения Чёрного моря. Более того, размерная структура черноморского нанофитопланктона позволяет также выявлять на цитограммах хорошо выраженные кластеры клеток сходного размера и внутриклеточного содержания пигментов, для которых возможно применение широкого спектра флуоресцентных зондов.

Выводы

В результате наших исследований установлено, что доля клеток в фазе G2 достоверно выше при высокой интенсивности освещения. Для всех исследуемых видов получена хорошо выраженная корреляция ($r^2 > 0,98$) между потенциальной скоростью роста микроводорослей, определяемой по митотическому индексу, и их удельной продукцией, измеряемой по приросту численности. На трех станциях в Севастопольской и Карантинной бухтах потенциальная скорость роста пико- и нанофитопланктона в поверхностном слое составляла 0,2–1,0 сут⁻¹ (круглогодичная съёмка в 2010 г., количество проб – 120). Максимумы этого показателя соответствовали годовым пикам численности сообществ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Парсонс Т.Р., Такахаши М., Харгрейв Б. Биологическая океанография. – М.: Легк. пром-сть, 1982. – 432 с.
- Стельмах Л.В., Губанов В.И., Бабич И.И. Сезонные изменения скорости роста и лимитирования фитопланктона питательными веществами в прибрежных водах Черного моря в районе Севостополя // Мор. экол. журн. – 2004. – 4. – С. 55–73.

- Стельмах Л.В., Куфтаркова Е.А., Акимов И.А., Бабич И.И., Кожемяка А.Б. Использование переменной флюоресценции хлорофилла *in vivo* для оценки функционального состояния фитопланктона // Система контроля окруж. среды. – 2010. – **13**. – С. 263–268.
- Antia A.N., Carpenter E.J., Chang J. Species specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. Accuracy of growth rate measurement in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1990. – **63**. – P. 273–279.
- Carpenter E.J., Chang J. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. Concept of the method // Ibid. – 1988. – **43**. – P. 105–111.
- Garcés E., Masy M. Phytoplankton potential growth rate versus increase in cell numbers: estimation of cell lysis // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 2001. – **212**. – P. 297–300.
- Garcés E., Delgado M., Maso M., Camp J. *In situ* growth rate and distribution of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium corsicum* Paulmier in an estuarine embayment (Alfacs Bay, NW Mediterranean Sea) // J. Plankt. Res. – 1999. – **21**(10). – P. 1972–1991.
- Jacquet S., Lennon J.-F., Marie D., Vaillot D. Picoplankton population dynamics in coastal waters of the N. W. Mediterranean Sea // Limnol. Oceanogr. – 1998. – **43**. – P. 1916–1931.
- Jacquet S., Partensky F., Casotti D.M., Vaillot D. Cell cycle regulation by light in *Prochlorococcus* strains // Appl. and Environ. Microbiol. – 2001a. – **67**(2). – P. 782–790.
- Jacquet S., Partensky F., Lennon J.-F., Vaillot D. Diel patterns of growth and division in marine picoplankton in culture // J. Phycol. – 2001b. – **37**. – P. 297–303.
- Jochem F.J., Meyerdierks D. Cytometric measurement of the DNA cell cycle in the presence of chlorophyll autofluorescence in marine eukaryotic phytoplankton by the blue – light excited dye YOYO-1 // Ibid. – 1999. – **185**. – P. 301–307.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaillot D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I // Appl. and Environ. Microbiol. – 1997. – **63**(1). – P. 186–193.
- Massie T.M., Blasius B., Weithoff G., Gaedke U., Fussmann G.F. Cycles, phase synchronization, and entrainment in single-species phytoplankton populations // Ecology. – 2010. – **107**(9). – P. 4236–4241.
- McDuff R.E., Chisholm S.W. The calculation of *in situ* growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification // Limnol. Oceanogr. – 1982. – **27**. – P. 783–788.
- Olson R.J., Chisholm S.W. Effects of light and nutrient limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri* // J. Plankt. Res. – 1986. – **8**. – P. 785–793.
- Olson R.J., Vaillot D., Chisholm S.W. Effects of environment stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species. // Plant Physiol. – 1986. – **80**. – P. 918–925.
- Pan Y., Cembella D. Flow cytometric determinations of cell cycle and growth rates of *Prorocentrum* spp. // VIII Int. Conf. Harm. Algae. Xunta de Galicia, Vigo, and Intergov. Oceanogr. Com. UNESCO. – 1998. – P. 173–174
- Peperzak L., Sandee B., Jonker R., Legrand C. Measurement of *Prorocentrum micans* growth rate by flow cytometric analysis of the diel DNA cycle // VIII Int. Conf. Harm. Algae.

Xunta de Galicia, Vigo, and Intergov. Oceanogr. Com. UNESCO. – 1998. – P. 177–178.

Vaulot D., Chisholm S.W. A simple model of the growth of phytoplankton populations in light/dark cycles // J. Plankt. Res. – 1987. – 9(2). – P. 345–366.

Поступила 19 июня 2013 г.

Подписала в печать Г.Г. Миничева

ISSN 0868-8540. *Algologia*. 2015, 25(1): 100–111 <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.100>

K.S. Solomonova, V.S. Mukhanov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas,
2, Nakhimov Ave., Sevastopol 99011, Crimea

CYTOMETRIC METHOD FOR DETERMINING THE POTENTIAL GROWTH RATE OF PHYTOPLANKTON ON THE MITOTIC INDEX

The effect of light intensity and light-dark cycle (12 : 12) on the percentage of cells with diploid DNA in monospecific cultures of microalgae *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, *Nitzschia* sp. 3, *Prorocentrum pusillum* Shiller, *P. cordatum* (Ostf.) Dodge, *Isochrysis galbana* Parke was studied by flow cytometry. It was shown that the proportion of cells in G2 phase was significantly higher in high-intensity lighting. In all species strong correlation ($r^2 > 0.98$) was revealed between the potential growth rate of algae determining by the mitotic index, and their specific production as measured by the increase in number. The possibility of flow cytometry use for cell cycle analysis and evaluation of potential growth rates of picophytoplankton and nanophytoplankton of the Black Sea. At three stations in Sevastopol and Quarantine bays potential growth rate of pico- and nanophytoplankton in the surface layer was 0.2–1.0 d⁻¹ (year-round sumpling in 2010 at 3 stations, totally 120 samples). Maximum values of this parameter corresponded to the number of annual peaks of phytoplankton number.

Key words: flow cytometry, microalgae, phytoplankton, mitotic index, growth rate, SYBR Green I.