

Оригинальная статья / Original article

УДК 551.46, 574.52

DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-9



Оценка численности бактерио-, пикофито- и нанофитопланктона Среднего Каспия методами проточной цитометрии

Владимир С. Муханов¹, Татьяна В. Рауэн¹, Сергей В. Востоков², Анастасия С. Востокова², Евгений Н. Лобачев³

¹Институт биологии южных морей РАН, Севастополь, Россия

²Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва, Россия

³Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанский федеральный исследовательский центр РАН, Махачкала, Россия

Контактное лицо

Сергей В. Востоков, к.б.н., ст. научный

сотрудник, Институт океанологии

им. П.П. Ширшова РАН; 117997 Россия,

г. Москва, Нахимовский проспект, 36.

Тел. +79096236875

Email vostokov_s@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0754-9325>

Формат цитирования

Муханов В.С., Рауэн Т.В., Востоков С.В.,

Востокова А.С., Лобачев Е.Н. Оценка

численности бактерио-, пикофито- и

нанофитопланктона Среднего Каспия методами

проточной цитометрии // Юг России: экология,

развитие. 2024. Т.19, N 3. С. 97-109.

DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-9

Получена 27 мая 2024 г.

Прошла рецензирование 23 июля 2024 г.

Принята 15 августа 2024 г.

Резюме

Цель: впервые методом проточной цитометрии изучить в Среднем Каспии структуру и функциональные характеристики бактерио-, пико- и нанофитопланктона в период цветения в начале сентября 2022 г.

Для количественной оценки гетеротрофного бактериопланктона, пикофито- и нанофитопланктона пробы воды отбирали на разных горизонтах (от поверхности до придонного слоя) на серии станций у западного побережья Каспийского моря на границе между его северной и центральной частями. Съёмку проводили в начале сентября 2022 г. в условиях гидрологического лета, при температуре на поверхности воды от 24,7°C до 26,7°C. Анализ проб проводили с помощью проточной цитометрии.

У северо-западного побережья Среднего Каспия были выявлены экстремально высокие концентрации пикофитопланктона (до $1,8 \times 10^5$ кл/мл), представленного, вероятно, пикоцианобактериями *Synechococcus*. Обнаружены также очень высокие значения обилия нанофитопланктона (до $1,6 \times 10^5$ кл/мл), в составе которого доминировали мелкие жгутиковые. Показано четкое пространственное разобщение пико- и нанофитопланктона. Максимумы нанофитопланктона были приурочены к зоне интенсивного цветения с высокими концентрациями хлорофилла *a*, тогда как пикофитопланктон достигал пиков обилия южнее, за пределами этой зоны. Обнаружено влияние термоклина на вертикальную структуру микробных сообществ. Под термоклином резко снижались концентрации пикофитопланктона и доля физиологически активных HNA-бактерий.

Полученные результаты свидетельствуют о ведущей роли мельчайших фототрофов в пелагиали Каспия и подчеркивают необходимость дальнейших комплексных исследований микробных сообществ Каспия современными методами.

Ключевые слова

Фитопланктон, пикофитопланктон, нанофитопланктон, *Synechococcus*, проточная цитометрия, Средний Каспий.

Estimation of bacterio-, picophyto- and nanophytoplankton abundance in the Middle Caspian Sea by flow cytometry

Vladimir S. Mukhanov¹, Tatiana V. Rauen¹, Sergey V. Vostokov², Anastasia S. Vostokova²
and Evgeny N. Lobachev³

¹A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia

²P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Caspian Institute of Biological Resources, Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Makhachkala, Russia

Principal contact

Sergey V. Vostokov, Senior Scientist, Department of Biology, P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences; 36 Nakhimovsky Prospekt, Moscow, Russia 117997.

Tel. +79096236875

Email vostokov_s@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0754-9325>

How to cite this article

Mukhanov V.S., Rauen T.V., Vostokov S.V., Vostokova A.S., Lobachev E.N. Estimation of bacterio-, picophyto- and nanophytoplankton abundance in the Middle Caspian Sea by flow cytometry. *South of Russia: ecology, development*. 2024; 19(3):97-109. (In Russ.) DOI: 10.18470/1992-1098-2024-3-9

Received 27 May 2024

Revised 23 July 2024

Accepted 15 August 2024

Abstract

Aim. For the first time, flow cytometry has been used to study the structure and functional characteristics of bacterio-, pico- and nanophytoplankton in the Middle Caspian during the bloom period in early September 2022.

Water samples were taken at different horizons (from the surface to the bottom layer) at a series of stations along the western coast of the Caspian Sea on the border between its northern and central parts to quantitatively assess heterotrophic bacterioplankton, picophyto- and nanophytoplankton. Sampling was undertaken in early September 2022 under summer hydrological conditions with water surface temperatures ranging from 24.7°C to 26.7°C. Sample analysis was performed using flow cytometry.

Extremely high concentrations of picophytoplankton (up to 1.8×10^5 cells/mL), probably of *Synechococcus picocyanobacteria*, were detected off the northwestern coast of the Middle Caspian. Very high values of nanophytoplankton abundance (up to 1.6×10^5 cells/mL), dominated by small flagellates, were also found. A clear spatial uncoupling of pico- and nanophytoplankton was revealed. Maximum levels of nanophytoplankton were confined to the area of intensive phytoplankton blooming with high concentrations of chlorophyll *a*, while picophytoplankton reached peak abundance further south, outside this area. The influence of the thermocline on the vertical structure of microbial communities was detected. The concentrations of picophytoplankton and the proportion of physiologically active HNA-bacteria decreased sharply under the thermocline.

The results obtained indicate the leading role of the smallest phototrophs in the Caspian pelagial and emphasise the need for further comprehensive studies of Caspian microbial communities using modern methods.

Key Words

Phytoplankton, picophytoplankton, nanophytoplankton, *Synechococcus*, flow cytometry, Middle Caspian.

ВВЕДЕНИЕ

Каспийское море – уникальный, высокопродуктивный бассейн с богатейшими биологическими ресурсами. Его меридиональное расположение, особенности батиметрии и влияния речного стока создают большое разнообразие гидролого-гидрохимических факторов, оказывающих влияние на сезонную и многолетнюю динамику планктонных сообществ Каспия [1–3]. Экосистемы Каспийского моря претерпевают серьёзные изменения, особенно в последние десятилетия, отмеченные непрерывным нарастанием антропогенного воздействия, связанного как с расширением добычи углеводородных ресурсов и прогрессирующей эвтрофикацией [1–5] так и биоинвазиями [6–17]. Роль этих факторов в трансформации региональных экосистем особенно хорошо проявляется в Северном Каспии и западной части Среднего Каспия [14–16], где и проводилось данное исследование.

Хотя фитопланктон Каспия изучается с середины прошлого века, выявлены и описаны его доминирующие виды, определён уровень продуктивности, исследована роль инвазивных видов и потенциально токсичных водорослей [17–27], сообщество фитопланктона всё ещё можно отнести к наименее изученным компонентам экосистем Каспия. Особенно это касается мельчайших фракций планктонных организмов. Так, пикофитопланктон (размером 0,2–2 мкм) практически не исследовался в Каспийском море, за исключением нескольких упоминаний [28]. Данные по нанофитопланктону (2–20 мкм) также носят фрагментарный характер, хотя

отмечается его существенный вклад в общую численность фитопланктона в отдельные периоды [28].

Все упомянутые выше исследования были выполнены с помощью классических методов количественного учёта микроорганизмов – микроскопии. В настоящей работе была предпринята первая попытка применения более современного подхода – проточной цитометрии, что, с одной стороны, позволило получить принципиально новые данные, но, вместе с тем, усложнило их сравнение с более ранними исследованиями. Таким образом, в рамках данной работы предполагалось получить методами проточной цитометрии новые сведения о бактерио-, пикофито- и нанофитопланктоне западной части Среднего Каспия в начале осени, когда наблюдается активное развитие фитопланктонного сообщества. Район съёмки был выбран таким образом, чтобы провести сравнение планктонных сообществ в зоне высоких концентраций хлорофилла, *a* (по спутниковым данным) и сопредельных водах с низким обилием фитопланктона.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Район и методы отбора проб. Для количественной оценки гетеротрофного бактериопланктона, пикофито- и нанофитопланктона пробы воды отбирали на разных горизонтах (от поверхности до придонного слоя) на серии станций у западного побережья Каспийского моря на границе между его северной и центральной частями (рис. 1). Съёмку проводили в начале сентября 2022 г. в условиях гидрологического лета, при температуре на поверхности воды от 24,7 °С до 26,7 °С.

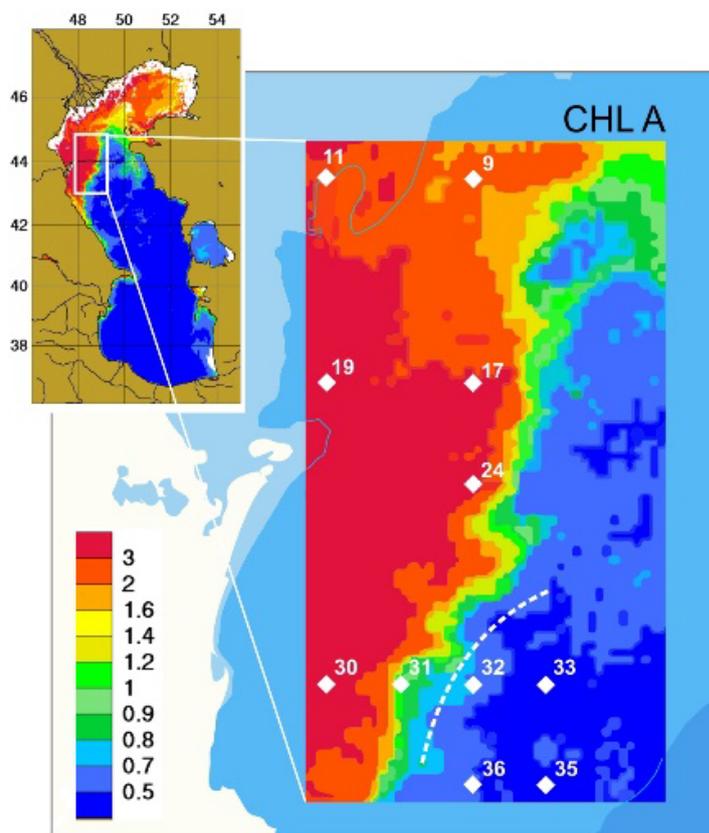


Рисунок 1. Расположение станций отбора проб в районе исследований и пространственное распределение концентрации хлорофилла *a* (CHL A, мг/м³) в поверхностном слое вод Каспийского моря в сентябре 2022 г.

Прерывистая линия – южная граница зоны цветения фитопланктона

Figure 1. Location of sampling stations in the study area and spatial distribution of chlorophyll *a* concentration (CHL A, mg/m³) in the surface layer of the Caspian Sea waters in September 2022.

The dashed line is the southern boundary of the phytoplankton bloom

Пробы разливали в 5-мл криопробирки, немедленно замораживали в жидком азоте и хранили до их анализа, который проводили на берегу в условиях стационарной лаборатории после окончания экспедиции.

Характеристика района исследований. Зона экстремально высоких концентраций хлорофилла *a* (2–8 мг/м³) формируется на северо-западе моря в течение всего года. От лета к осени она расширяется на юг по всему периметру зоны речного влияния, а также распространяется в южном направлении вдоль западного побережья Каспия, где и располагался полигон исследований. Возрастание концентраций происходит синхронно с ростом температуры, а летний пик развития фитопланктона формируется в период наибольшего прогрева поверхностного слоя и обусловлен, по-видимому, поступлением с речными водами органического вещества и биогенных элементов. Южная часть полигона исследований расположена в Среднем Каспии, воды которого вовлечены в циркуляцию Дербентского циклонического круговорота. Это наименее продуктивный район моря с содержанием хлорофилла в пределах 0.25–1.0 мг/м³. Его пиковые концентрации наблюдают в сентябре-октябре в период ослабления инсоляции и начала активного ветрового перемешивания [3].

Проточная цитометрия. Цитометрический анализ проб проводили в условиях стационарной лаборатории с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488-нм однофазным аргонным лазером и программного обеспечения СХР. Обработку цитометрических данных вели с помощью программного обеспечения Flowing Software v. 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland, www.floowingsoftware.com).

Общую численность пико- и нанопланктона определяли в неокрашенных пробах с помощью

гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (канал FS) и автофлуоресценции в красной (FL4, 675 нм) и оранжевой (FL2, 575 нм) областях спектра на безразмерных логарифмических шкалах (рис. 2). Идентификацию кластеров фикоэритрин-содержащего пикофитопланктона (PPE⁺) и нанопланктона (NPE⁺) в пространстве цитометрических переменных проводили по размерам клеток (канал FS) и оранжевой флуоресценции (канал FL2) фикоэритрина (PE) в соответствии с [30]. Эти группы образуют характерные кластеры на цитограммах, которые характеризуются высоким содержанием фикоэритрина (рис. 2 (б) и (в)). Величины сигналов FL4 и FL2, измеряемые для индивидуальных клеток, служили мерой внутриклеточного содержания пигментов – соответственно, хлорофилла *a* и фикоэритрина. Настройки прибора (усиление и вольтаж каналов измерения) и конфигурация гейтов на цитограммах соответствовали тем, что применялись в исследованиях черноморского пико- и нанопланктона [30–32].

Численность бактерий определяли в пробах, окрашенных SYBR Green I (Molecular Probes, США), с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах [33]. Окраску бактерий SYBR Green I проводили в соответствии с [29]. Это флуорохром повышенной яркости с максимумами возбуждения и эмиссии, соответственно, 497 и 521 нм. Он обладает высоким сродством к двухцепочечной ДНК, но способен также связываться с РНК и одноцепочечной ДНК. Рабочий раствор красителя SYBR Green I готовили в разбавлении 10⁻² и хранили в замороженном состоянии при –20 °С. Конечное разбавление в пробе составляло 10⁻⁴. Окраску проводили в темноте в течение 30 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями.

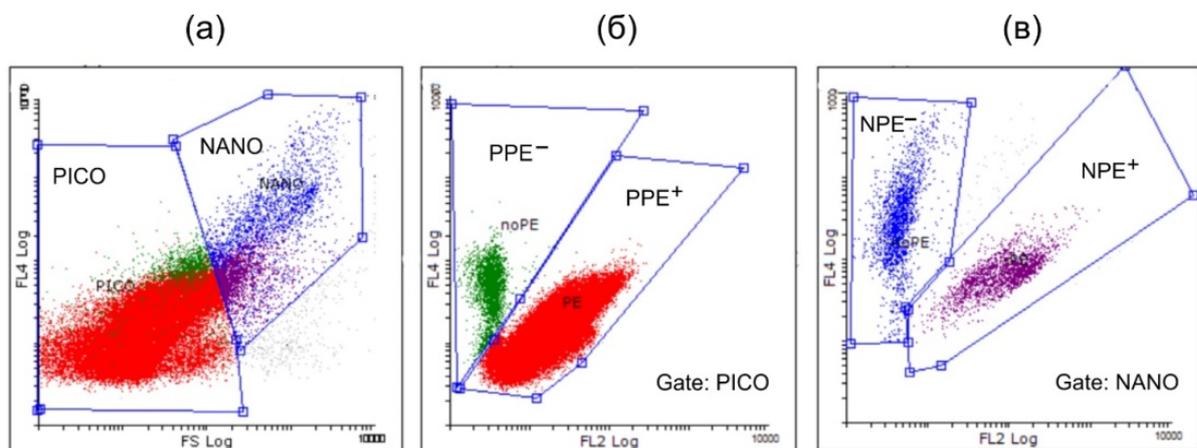


Рисунок 2. Идентификация полученных с помощью проточной цитометрии кластеров фитопланктона Каспийского моря: пикофито- (PICO) и нанопланктона (NANO) в пространстве переменных прямого светорассеивания (FS) и красной флуоресценции (FL4) хлорофилла (а); содержащего (PPE⁺) и не содержащего (PPE⁻) фикоэритрин (FL2) пикофитопланктона (б); содержащего (NPE⁺) и не содержащего (NPE⁻) фикоэритрин нанопланктона (в)

Figure 2. Identification of the phytoplankton clusters of the Caspian Sea obtained using flow cytometry: picophyto- (PICO) and nanophytoplankton (NANO) in the space of phycoerythrin-containing (NPE⁺) and phycoerythrin-free (NPE⁻) nanophytoplankton (c), variables of forward light scattering (FS) and red fluorescence (FL4) of chlorophyll (a); phycoerythrin-containing (PPE⁺) and phycoerythrin-free (PPE⁻) (FL2) picophytoplankton (b)

Внутриклеточное содержание нуклеиновых кислот в бактериальных клетках, измеряемое с помощью проточного цитометра (канал FL1), служило показателем их физиологической активности. Бактерии с высоким содержанием нуклеиновых кислот (HNA-бактерии) представляют собой физиологически активные клетки, в отличие от LNA – бактерий с их низким содержанием [35; 36]. HNA-бактерии идентифицировали по высокой интенсивности флуоресценции в зеленой части спектра (канал FL1, 525 нм) после их окраски SYBR Green I.

Концентрацию клеток бактерио- и фитопланктона рассчитывали по скорости протока пробы (соответственно, 15 и 60 мкл мин⁻¹), времени счёта (60–480 сек.) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (в пробах пикофитопланктона – минимум 3000 кл.). Контроль качества измерений проводили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Калибровку цитометрических измерений размеров клеток по каналу FS проводили с помощью разноразмерных (0.2–10 мкм) флуоресцентных микросфер (Beckman Coulter, Molecular Probes, США). Размеры клеток (L, мкм) рассчитывали на основе данных канала FS как величину «диаметра эквивалентной сферы» (ESD), объём которой равен объёму клетки независимо от её морфологии.

Таким образом, с помощью проточной цитометрии было исследовано 20 переменных, которые характеризовали структуру и функциональные показатели бактерио- и мелкого фитопланктона.

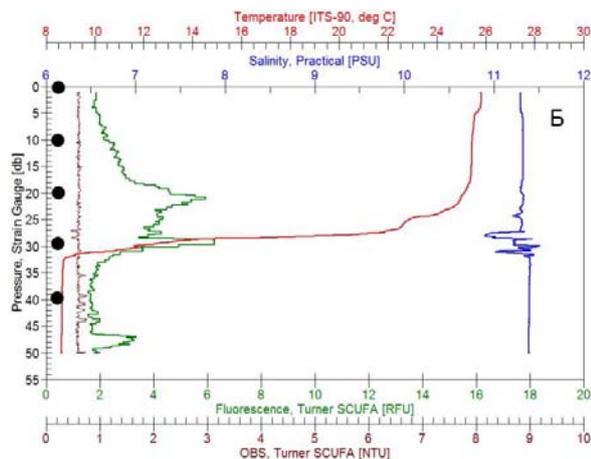
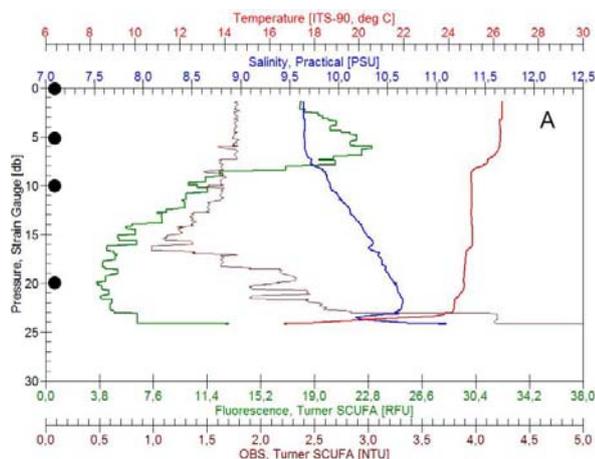


Рисунок 3. Типичные вертикальные профили температуры, солёности и флуоресценции на станции 30 в зоне максимума хлорофилла *a* (А) и на станции 33 за её пределами (Б)

Чёрными кружками отмечены горизонты отбора проб

Figure 3. Typical vertical profiles of temperature, salinity and fluorescence at station 30 in the chlorophyll *a* maximum zone (A) and at station 33 beyond (B)

Black circles indicate sampling layers

На ст. 33, расположенной за пределами зоны цветения фитопланктона (рис. 3Б), толщина ВКС была больше, хорошо выраженный термоклин залегал на глубине около 30 м. Температура под термоклином падала до 9°C. Концентрация хлорофилла здесь была существенно ниже, максимумы флуоресценции (до 6 отн. ед.) располагались непосредственно над термоклином. Под термоклином на глубине около 47 м был зарегистрирован ещё один небольшой пик флуоресценции, но его происхождение не было выяснено, поскольку отбор проб на этом горизонте не производили. Таким

образом, были выявлены существенные отличия в гидрологии и вертикальной структуре сообщества фитопланктона между зоной цветения и окружающими водами.

Спутниковые данные. Для расчета концентраций хлорофилла, *a* в поверхностном слое Каспийского моря в период исследований использовали данные сканера цвета MODIS-Aqua второго уровня [37] (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov>) и региональный алгоритм, разработанный в ИО РАН [38].

Статистический анализ. Многомерный статистический анализ (NMDS – непараметрическое многомерное шкалирование) микробиологических данных, полученных в разных районах исследования, проводили с помощью программы PAST version 3.16 [39] и индекса Брея–Кертиса в качестве метрики, построение графиков – в программе Grapher 8 (Golden Software, Inc.).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 3 представлены типичные вертикальные профили температуры, солёности и флуоресценции хлорофилла на двух станциях – в зоне цветения (ст. 30) и за её пределами (ст. 33). На ст. 30 (рис. 3А) Верхний квазиоднородный слой (ВКС) распространялся до глубины около 24 м, его температура составляла 24–26 °С. Термоклин располагался у самого дна. Профиль солёности показал слабую стратификацию, её величина плавно возрастала от 9,5 до 10,5 ‰. Максимум флуоресценции (24 отн. ед.) был зарегистрирован у самой поверхности на глубине 5–7 м. Ниже 10 м наблюдали резкое снижение флуоресценции, что указывало на локализацию основной биомассы фитопланктона в относительно тонком (около 10 м) подповерхностном слое в верхней части ВКС.

Описательная статистика исследованных переменных, характеризующих структуру и функциональные показатели бактерио- и мелкого фитопланктона, приведена в табл. 1. Численности пикофитопланктона (PICO *N*) в исследованном районе Каспийского моря достигали исключительно высоких значений – до 1.8×10^5 кл/мл, и составляли, в среднем,

$6.7 \pm 4.6 \times 10^4$ кл/мл (здесь и далее указаны значения станд. откл.) (табл. 1). При этом, биомассы пикофитопланктона не превышали 0.35 мг сыр.в./л из-за малых размеров клеток, и составляли 0.21 ± 0.09 мг сыр. в./л

(табл. 1). Биомасса нанофитопланктона была на два порядка выше (19.8 ± 28.5 мг сыр. в./л) и достигала почти 96 мг сыр. в./л (табл. 1).

Таблица 1. Обозначения, единицы измерения и статистики исследуемых переменных
Table 1. Designations, units and statistics of the variables studied

Переменная / Variable		Min	Max	$m \pm SD$
PPE ⁺ N	Численность PE ⁺ -пикофитопланктона, 10 ³ кл/мл Abundance of PE ⁺ -picophytoplankton, 10 ³ cells/ml	7.2	166.6	53.3 ± 46.5
PPE ⁺ S	Размеры клеток PE ⁺ -пикофитопланктона, мкм Cell size of PE ⁺ -picophytoplankton, μm	1.5	2.1	1.8 ± 0.2
PPE ⁺ B	Биомасса PE ⁺ -пикофитопланктона, мг/л Biomass of PE ⁺ -picophytoplankton, mg/l	0.03	0.30	0.15 ± 0.09
PPE ⁻ N	Численность PE ⁻ -пикофитопланктона, 10 ³ кл/мл Abundance of PE ⁻ -picophytoplankton, 10 ³ cells/ml	0.3	40.1	13.6 ± 10.9
PPE ⁻ S	Размеры клеток PE ⁻ -пикофитопланктона, мкм Cell size of PE ⁻ -picophytoplankton, μm	1.7	2.2	2.0 ± 0.2
PPE ⁻ B	Биомасса PE ⁻ -пикофитопланктона, мг/л Biomass of PE ⁻ -picophytoplankton, mg/l	0.001	0.21	0.06 ± 0.06
NPE ⁺ N	Численность PE ⁺ -нанофитопланктона, 10 ³ кл/мл Abundance of PE ⁺ -nanophytoplankton, 10 ³ cells/ml	0.8	18.7	8.9 ± 5.2
NPE ⁺ S	Размеры клеток PE ⁺ -нанофитопланктона, мкм Cell size of PE ⁺ -nanophytoplankton, μm	3.8	8.0	5.7 ± 1.3
NPE ⁺ B	Биомасса PE ⁺ -нанофитопланктона, мг/л Biomass of PE ⁺ -nanophytoplankton, mg/l	0.13	3.32	0.95 ± 0.91
NPE ⁻ N	Численность PE ⁻ -нанофитопланктона, 10 ³ кл/мл Abundance of PE ⁻ -nanophytoplankton, 10 ³ cells/ml	0.5	148.6	42.6 ± 44.4
NPE ⁻ S	Размеры клеток PE ⁻ -нанофитопланктона, мкм Cell size of PE ⁻ -nanophytoplankton, μm	4.2	12.8	8.2 ± 2.6
NPE ⁻ B	Биомасса PE ⁻ -нанофитопланктона, мг/л Biomass of PE ⁻ -nanophytoplankton, mg/l	0.09	92.60	18.85 ± 27.60
PICO N	Общая численность пикофитопланктона, 10 ³ кл/мл Total abundance of picophytoplankton, 10 ³ cells/ml	19.7	184.5	66.9 ± 46.3
NANON	Общая численность нанофитопланктона, 10 ³ кл/мл Total abundance of nanophytoplankton, 10 ³ cells/ml	1.3	160.6	51.5 ± 47.0
PICO B	Общая биомасса пикофитопланктона, мг/л Total biomass of picophytoplankton, mg/l	0.04	0.35	0.21 ± 0.09
NANO B	Общая биомасса нанофитопланктона, мг/л Total biomass of nanophytoplankton, mg/l	0.21	95.91	19.80 ± 28.50
BAC N	Общая численность бактериопланктона, 10 ⁶ кл/мл Total abundance of bacterioplankton, 10 ⁶ cells/ml	1.0	7.6	3.5 ± 2.0
BAC V	Объемы клеток бактерий, мкм ³ Cell volume of bacteria, μm ³	0.23	0.53	0.35 ± 0.08
BAC B	Общая биомасса бактериопланктона, мг/л Total biomass of bacterioplankton, mg/l	0.22	2.48	1.25 ± 0.72
HNA%	Доля HNA-бактерий, % Proportion of HNA-bacteria, %	41	87	73 ± 12

Характер пространственного распределения количественных показателей пико- и нанофитопланктона в поверхностном слое исследованного полигона сильно отличался (рис. 4). Максимумы обилия и биомассы нанофитопланктона наблюдали в его северной части – в пределах зоны цветения фитопланктона и высоких концентраций хлорофилла. Наоборот, пикофитопланктон достигал максимального обилия на юге, преимущественно, за пределами зоны цветения (рис. 4). В целом, характер распределения биомассы обеих групп был схожим, а отличия между биомассой и численностью микроорганизмов, были обусловлены вариабельностью их средних размеров, которые составляли, соответственно, 1.5–2.2 мкм и 3.8–12.8 мкм у пикофито- и нанофитопланктона. По этой причине,

максимумы численности (ст. 11) и биомассы (ст. 17) нанофитопланктона не совпадали в пространстве (рис. 4).

В сообществе пикофитопланктона количественно преобладали формы, содержащие фикоэритрин (PPE⁺). Существенно менее многочисленный пикофитопланктон, не содержащий фикоэритрина (PPE⁻), отличался по своему пространственному распределению – его максимумы располагались на севере полигона (ст. 11) в зоне цветения фитопланктона, где он количественно превосходил PPE⁺. Обратную картину наблюдали в нанофитопланктоне – количественное преобладание NPE⁻ над NPE⁺. Первые преобладали на севере полигона (ст. 11), вторые – на юге (ст. 30), но в пределах зоны цветения.

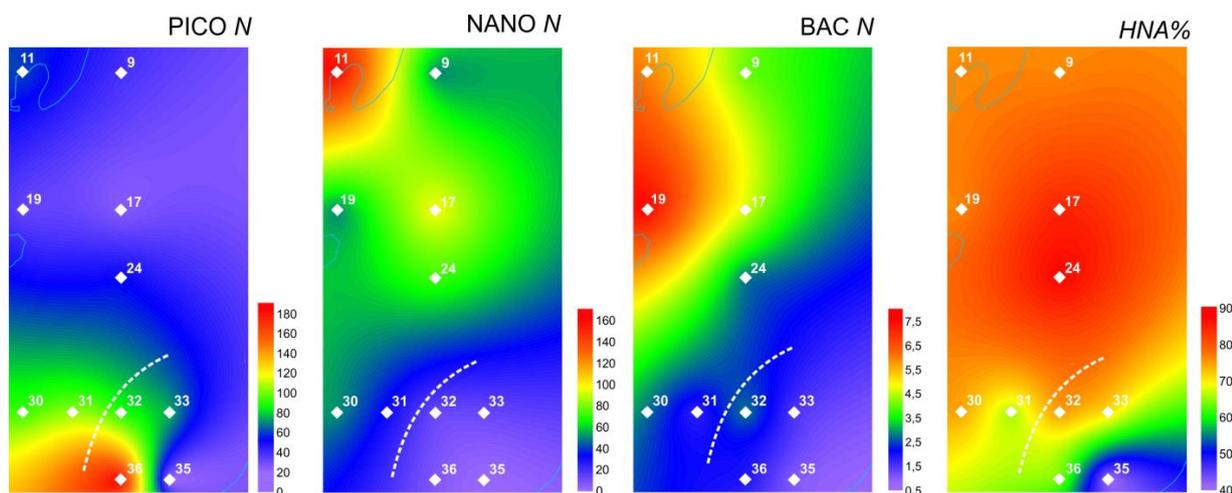


Рисунок 4. Пространственное распределение общей численности пикофитопланктона (PICO *N*), нанофитопланктона (NANO *N*), бактериопланктона (BAC *N*) и доли HNA-бактерий (HNA%) на полигоне в Каспийском море в сентябре 2022 г. Единицы измерения представлены в табл. 1. Показано расположение станций отбора проб. Прерывистая линия – южная граница зоны цветения фитопланктона в поверхностном слое

Figure 4. Spatial distribution of the total abundances of picophytoplankton (PICO *N*), nanophytoplankton (NANO *N*), bacterioplankton (BAC *N*) and the proportion of HNA-bacteria (HNA%) at the study area in the Caspian Sea in September 2022. Units are presented in Table 1. The location of sampling stations is shown. The dashed line marks the southern boundary of the phytoplankton bloom.

Осенние численности и биомассы бактериопланктона западного Каспия составляли, соответственно, $3.5 \pm 2.0 \times 10^6$ кл/мл и 1.25 ± 0.72 мг/л и в некоторых районах достигали очень высоких значений: 7.6×10^6 кл/мл (ст. 19) и 2.48 мг/л (ст. 17) (табл. 1). Доля физиологически активных бактериальных клеток была высока, $73 \pm 12\%$, на ст. 24 она составляла почти 90 % (рис. 4). Массовое развитие бактериопланктона наблюдали, преимущественно, в зоне цветения фитопланктона и максимумов концентрации хлорофилла, что было вполне объяснимо большим количеством РОВ, поступающим в воды во время цветения (рис. 4).

Пространственное деление полигона исследований на две чётко очерченные акватории – зону интенсивного цветения фитопланктона (ст. 9–30) и сопредельную акваторию (ст. 32–36), позволяло более детально исследовать факторы, контролирующие развитие микробных сообществ поверхностного слоя Каспия в осенний период. Для этого мы сравнивали переменные, полученные в каждой из зон (рис. 5). Статистически достоверные отличия были ожидаемо выявлены для основных количественных (BAC *N*, BAC *B*) и функциональных (HNA%) показателей бактериопланктона, хотя размеры бактериальных клеток менялись незначительно. Районы также достоверно отличались по количественным показателям нанофитопланктона (NPE⁺ *B*, NPE⁻ *N*, NPE⁻ *B*, NANO *B*), однако результаты сравнения по пикофитопланктону оказались не столь очевидными. В частности, выяснилось, что зона цветения достоверно отличалась только лишь более высокими значениями среднего размера клеток PE-содержащего пикофитопланктона и биомасс PPE⁻ (рис. 5).

Характер вертикального распределения микробиологических переменных зависел, в первую очередь, от глубины места и расположения термоклина. В зоне цветения фитопланктона глубины были небольшие, до 25 м, термоклин залегал у самого дна и, таким образом, не оказывал влияния на

вертикальную структуру микробного сообщества (рис. 6). Южнее, за пределами высоких концентраций хлорофилла *a*, глубины увеличивались, термоклин заглублялся почти до 30 м. Под термоклином наблюдали значительное снижение численности и биомассы пикофитопланктона, а также доли физиологически-активных HNA-бактерий (рис. 6).

В нашем исследовании проточная цитометрия была впервые применена для количественной оценки бактериопланктона и мельчайшего (пико- и нано-) фитопланктона Каспийского моря. Этот современный метод всё шире используется в исследованиях водных экосистем [30–32; 40; 41], что обусловлено рядом его преимуществ перед традиционной микроскопией. В соответствии с результатами методических исследований, проточная цитометрия более точна и эффективна при оценке численности планктонных организмов в диапазонах размеров до 50 мкм [42], включая пикофитопланктон [43], однако с увеличением размеров объектов (например, при работе с нанофитопланктоном) расхождения в результатах становятся менее заметными [43]. Тем не менее, мы столкнулись с трудностями в интерпретации полученных нами цитометрических данных. В отличие от черноморских проб, в которых субкластеры пико- и нанопланктона хорошо различались, более многочисленный мельчайший фитопланктон Каспия был представлен на цитограммах единым кластером (рис. 2а), а его классификация на пико- и нанофракции была, скорее, формальной. Это хорошо заметно и по расположению кластеров содержащих и не содержащих фикоэритрин клеток в каждой из размерных фракций (рис. 2б и 2в). Микроскопическое исследование выявило высокие концентрации в каспийских пробах мельчайших (2–8 мкм) жгутиковых. Их присутствие объясняло выровненность размерного спектра фитопланктона и трудности в дифференциации кластеров пико- и нанофитопланктона на цитограммах.

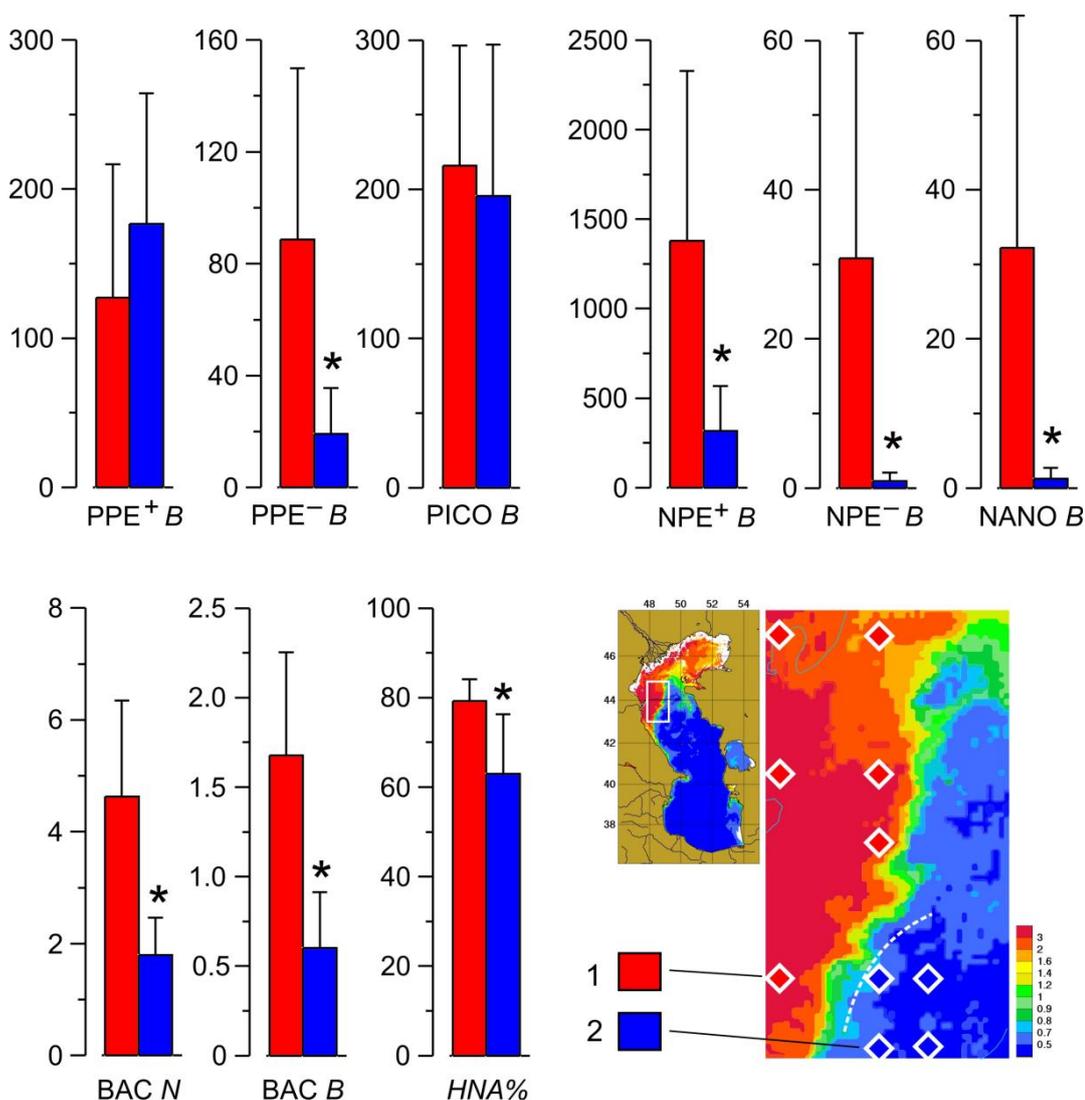


Рисунок 5. Сравнение исследованных переменных в зоне цветения фитопланктона (■) и за её пределами (■) в северо-западной части Каспийского моря в сентябре 2022 г. Обозначения и единицы измерения переменных представлены в табл. 1. Статистически достоверные ($p < 0.05$) отличия отмечены звездочкой

Figure 5. Comparison of the studied variables studied in the phytoplankton bloom area (■) and outside it (■) in the northwestern part of the Caspian Sea in September 2022. Designations and units of variables are presented in Table 1. Statistically significant ($p < 0.05$) differences are marked with an asterisk

Численности фотосинтезирующего пикофитопланктона, полученные нами для каспийских вод с помощью проточной цитометрии, достигали $1,8 \times 10^5$ клеток/мл, т.е. существенно превышали величины, ранее определенные для пикофитопланктона Чёрного моря (не выше 5×10^4 клеток/мл) [30; 31]. Какие-либо сравнения с количественными данными по Каспийскому морю пока не представляются возможными, поскольку его пикофитопланктон по-прежнему остаётся практически не исследованным. Однако, происходит постепенное накопление качественных данных, полученных молекулярными методами, которые указывают на высокие концентрации в каспийских водах пикоцианобактерий рода *Synechococcus*. В частности, с помощью метагеномного анализа было продемонстрировано большое значение штамма SBO205 из субкластера 5.2 пикоцианобактерий [44]. На важную роль *Synechococcus* в пелагиали Каспия также косвенно указывали результаты исследования виромов [45]. В водах Северного Каспия были найдены виротипы, инфицирующие этот род пикоцианобактерий, в частности – цианофаги S-CBS4, которые

относятся к сифовирусам. Кроме того, функциональный анализ метагеномного секвенирования выявил присутствие цианофагов S-SKS1 и S-SSM7, которые относятся к миовирусам и также специфичны к синехококкусу [45]. Таким образом, наши данные указывают на то, что фикоэритрин-содержащий пикофитопланктон (PPE⁺), высокие концентрации которого были обнаружены нами в Среднем Каспии (до $1,7 \times 10^5$ клеток/мл), мог быть представлен преимущественно пикоцианобактериями рода *Synechococcus*.

Нанофитопланктон Каспия исследован несколько лучше по той причине, что мелкие жгутиковые – одна из групп фитопланктона, которая количественно определяется методами световой микроскопии. В разных работах в её состав включали клетки разных размерных диапазонов. В частности, в летний период отмечалось высокое обилие жгутиковых во фракции 4–10 мкм, которые вносили наибольший вклад в общую биомассу фитопланктона в сезонном термоклине [1; 3]. Численность мелких флагеллят также периодически возрастала в поверхностном слое в северо-западной части Среднего Каспия, при этом

максимальные биомассы (до $1,3 \text{ г/м}^3$) были обнаружены в осенний период [1; 3]. Другие авторы [46], утверждают, что для современной структуры летнего фитопланктона прибрежных мелководий дагестанского сектора Каспия характерно достаточно высокое флористическое разнообразие и преобладание мелкоклеточных форм (включая мелких жгутиковых). Те величины численности (до $1,6 \times 10^5$ клеток/мл) и

биомассы (до 96 мг/л) нанофитопланктона, которые мы получили в данном исследовании, можно охарактеризовать как исключительно высокие. Это может быть связано с применением проточной цитометрии, но однозначно указывает на то, что мельчайшие формы фотоавтотрофов, включая пико- и нанофитопланктон, могут играть гораздо более важную роль в функционировании экосистем Каспия, чем это видится сейчас.

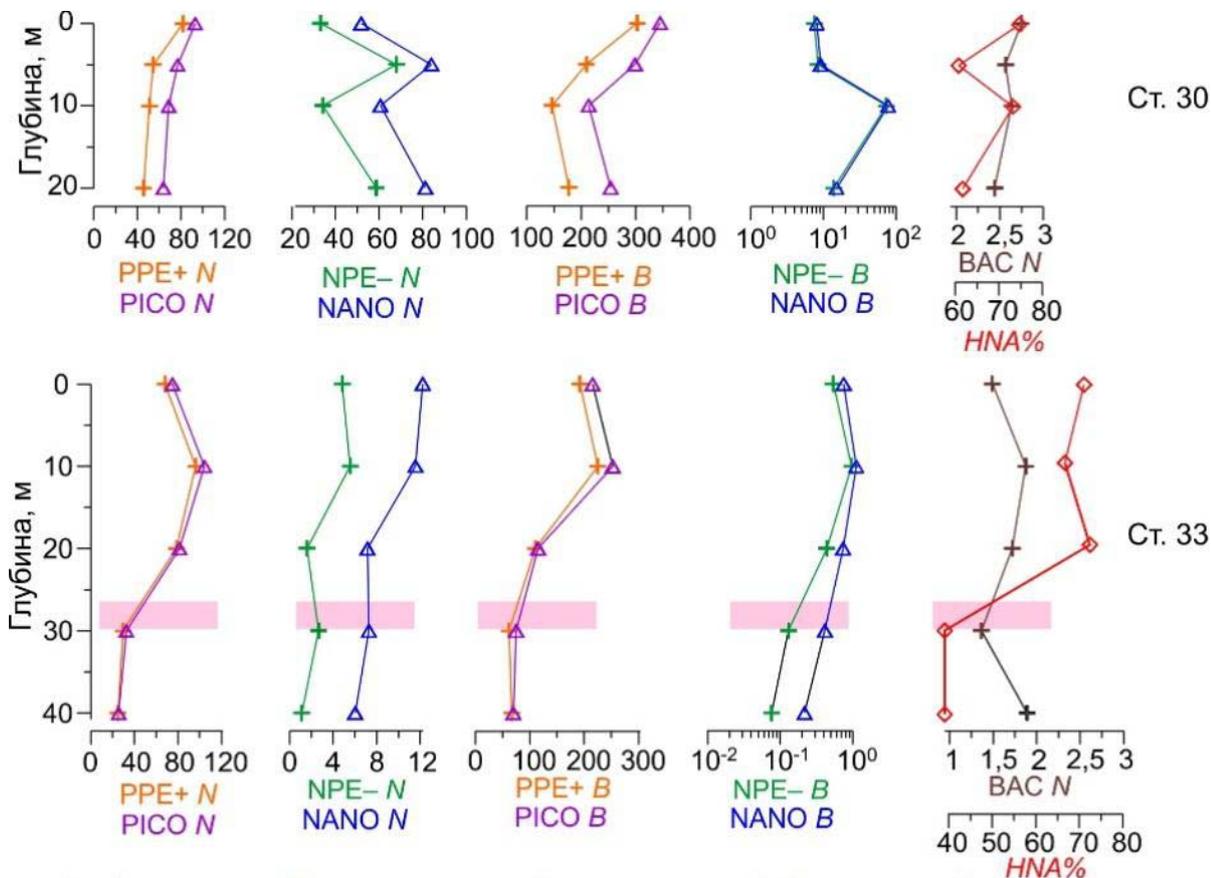


Рисунок 6. Вертикальное распределение исследованных переменных в зоне цветения фитопланктона (ст. 30) и сопредельных водах (ст. 33) на полигоне в западной части Каспийского моря в сентябре 2022 г.

Обозначения и единицы измерения переменных представлены в табл. 1. На ст. 33 показана глубина залегания термоклина

Figure 6. Vertical distribution of the studied variables studied in the phytoplankton bloom area (station 30) and adjacent waters (station 33) in the western part of the Caspian Sea in September 2022

The designations and units of variables are presented in Table 1. The depth of occurrence of the thermocline is shown for station 33

В нашем исследовании также было выявлено пространственное разобщение между пико- и нанофитопланктоном, которое заключалось в том, что максимумы нанофитопланктона были приурочены к зоне интенсивного цветения фитопланктона и высоких концентраций хлорофилла *a*, в то время как пикофитопланктон достигал максимального обилия за пределами этой зоны. Способность пикоформ существовать при значительно более низких концентрациях биогенных элементов и, таким образом, успешно конкурировать с нано- и микрофитопланктоном в подобных условиях, может служить одним из объяснений наблюдаемого нами пространственного распределения фитопланктона.

В соответствии с нашими данными, температурная стратификация водного столба и положение термоклина также оказывали заметное влияние на вертикальное распределение микробных сообществ. В частности, под термоклином резко снижалось обилие пикофитопланктона и доля метаболически активных

HNA-бактерий. Действительно, HNA-бактерии могут доминировать в верхнем, лимитированном по азоту слое [48], тогда как на вертикальное распределение LNA-бактерий в большей степени оказывают влияние гидродинамические процессы [48]. Таким образом впервые с применением проточной цитометрии получены количественные данные о бактериопланктоне и мельчайшем (пико- и нано-) фитопланктоне Каспийского моря. Показаны чрезвычайно высокие концентрации пико- и нанофитопланктона в водах Среднего Каспия. Выявлено пространственное разобщение между пико- и нанофитопланктоном – максимумы нанофитопланктона приурочены к зоне интенсивного цветения фитопланктона, а пикофитопланктон достигает максимального обилия за её пределами. Показана важная роль температурной стратификации и положения термоклина в формировании вертикального распределения микробных сообществ Каспия. Полученные данные свидетельствуют, что мельчайшие формы фотоавтотрофов (пико- и

нанопланктон) могут играть гораздо более значимую роль в функционировании каспийских экосистем, чем предполагалось ранее. Необходимы дальнейшие комплексные исследования пространственно-временной динамики и факторов контроля микробных сообществ Каспийского моря с использованием современных методов, в частности – проточной цитометрии.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ N 20–54–56053, Госзадания № 121040600178-6 и № 0128-2021-0004.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the RFBR according to the research project № 20-54-56053, State Assignment, Projects №121040600178-6 and № 0128-2021-0004.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Востоков С.В., Курашов Е.А., Курьянова О.Ю., Цельмович О.Л., Дмитриев А.В., Островский Д.И., Ковалев М.Ю. Фитопланктон Среднего Каспия: анализ изменений структуры сообщества за последние десятилетия // Юг России: экология, развитие. 2022. Т. 17. N 3. С. 112–124. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2022-3-112-124>
2. Востоков С.В., Лобковский Л.И., Востокова А.С., Соловьев Д.М. Сезонная и многолетняя изменчивость фитопланктона в Чёрном море по данным дистанционного зондирования и контактными измерениями хлорофилла а // Доклады Академии наук. 2019. Т. 485. N 1. С. 99–103. <https://doi.org/10.31857/S0869-5652485199-103>
3. Vostokov S.V., Pautova L.A., Sahling I.V., Vostokova A.S., Gadzhiev A.A., Petherbridge G., Lobachev E.N., Abtahi B., Shojaei M.G. Seasonal and Long-Term Phytoplankton Dynamics in the Middle Caspian According to Satellite Data and In Situ Observations in the First Decades of the 21st Century // Journal of Marine Science and Engineering. 2023. V. 9. N 11. P. 957. <https://doi.org/10.3390/jmse11050957>
4. Паутова Л.А., Кравчишина М.Д., Востоков С.В., Зацепин А.Г., Ключиткин А.А., Островский А.Г., Флинт М.В. Особенности вертикальной структуры летнего фитопланктона глубоководных районов Каспийского моря // Доклады РАН. 2015. Т. 462. N 4. С. 479–483.
5. Востоков С.В., Салинг И.В., Востокова А.С., Гаджиев А.А., Лобачев Е.Н., Абтахи Б., Шозаи М.Г. Изучение сезонной и многолетней изменчивости хлорофилла "а" в Каспийском море по данным дистанционного зондирования // Доклады Российской академии наук. Науки о Земле. 2023. Т. 509. N 1. С. 134–140. <https://doi.org/10.31857/S2686739722602770>
6. Chen J.L., Pekker T., Wilson C.R., Tapley B.D., Kostianoy A.G., Cretaux J.-F., Safarov E.S. Long-term Caspian Sea level change // Geophysical Research Letters. 2017. V. 44. P. 6993–7001. <https://doi.org/10.1002/2017GL073958>
7. Сапожников В.В., Мордасова Н.В., Метревели М.П. Трансформация экосистемы Каспийского моря при понижении и повышении уровня // Океанология. 2010. Т. 50. N 4. С. 524–533.
8. Востоков С.В., Гаджиев А.А., Востокова А.С., Рабазанов Н.И. Гребневик *Beroe cf. ovata* в Каспийском море. Начало нового этапа эволюции Каспийской экосистемы? // Юг России: экология, развитие. 2020. Т. 15. N 4. С. 21–35. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-4-21-35>
9. Востоков С.В., Гаджиев А.А., Лобачев Е.Н., Востокова А.С., Рабазанов Н.И., Бархалов Р.М., Сапожников Ф.В., Абтахи Б., Шозаи М.Г. Развитие и взаимодействие популяций гребневику *Beroe ovata* Bruguère, 1789 и *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 в прибрежной зоне Среднего Каспия // Юг России: экология, развитие. 2022. Т. 17. N 4. С. 8–15. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2022-4-8-15>
10. Зимица Т.Н., Ардабьева А.Г., Котельников А.В. Характеристика современного состояния фитопланктонных вселенцев Каспийского моря // Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление. 2022. N 3. С. 101–110.
11. Шакирова Ф.М. Вселенцы каспийского моря – угроза биоразнообразию его экосистемы // Проблемы сохранения экосистемы Каспия в условиях освоения нефтегазовых месторождений. Астрахань, 18 октября, 2019. С. 191–196.
12. Зарбалиева Т.С., Ахундов М.М., Касимов А.М., Надиров С.Н., Гусейнова Г.Г. Воздействие инвазивных видов на аборигенную фауну Каспийского моря в прибрежных водах Азербайджана // Российский журнал биологических инвазий. 2016. N 2. С. 33–48.
13. Паутова Л.А., Кравчишина М.Д., Силкин В.А., Лисицын А.П. Феномен массового развития инвазивной потенциально токсичной динофлагелляты *Gonyaulax polygramma* в глубоководных районах Каспийского моря // Доклады РАН. 2017. Т. 474. N 2. С. 657–661. <https://doi.org/10.1134/S1028334X17060071>
14. Ардабьева А.Г., Татаринцева Т.А. Характеристика летнего фитопланктона Каспийского моря. Морские гидробиологические исследования. М.: ВНИРО, 2000. С. 22–38.
15. Паутова Л.А., Кравчишина М.Д., Силкин В.А., Ключиткин А.А., Артемьев В.А., Вазюля С.В., Буренков В.И. Диатомовые виды - вселенцы в осеннем фитопланктоне Каспийского моря: роль в формировании общей биомассы и распределение в поле солёности // Российский журнал биологических инвазий. 2022. Т. 15. N 2. С. 68–82.
16. Kosarev A.N. Physico-Geographical Conditions of the Caspian Sea. The Caspian Sea Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. P. 5–31. <https://doi.org/10.1007/6985002>
17. Кун М.С. Планктон Каспийского моря в условиях зарегулирования стока Волги. Изменение биологических комплексов Каспийского моря за последние десятилетия. М.: Наука, 1965. С. 54–97.
18. Прошкина-Лавренко А.И., Макарова И.В. Водоросли планктона Каспийского моря. Л.: Наука, 1968. 291 с.
19. Бабаев Г.Б. Состав и распределение фитопланктона в Среднем и Южном Каспии. Биология Среднего и Южного Каспия. М.: Наука, 1968. С. 50–63.
20. Левшакова В.Д. Некоторые экологические особенности фитопланктона Северного Каспия // Труды Каспнирха. 1971. Т. 26. С. 67–82.
21. Левшакова В.Д., Санина Л.В. Летний фитопланктон Среднего Каспия до и после вселения ризосолении // Труды ВНИРО. 1973. Т. 80. С. 18–27.
22. Левшакова В.Д. Фитопланктон. Каспийское море. Фауна и биологическая продуктивность. М.: Наука, 1985. С. 23–54.
23. Салманов М.А. Роль микрофлоры и фитопланктона в продукционных процессах Каспийского моря. М.: Наука, 1987. 214 с.
24. Бородин В.Е. Летний фитопланктон разных размерных групп Среднего и Южного Каспия. Рыбохозяйственные исследования планктона. Часть 2. Каспийское море. М.: ВНИРО, 1991. С. 102–110.
25. Санина Л.В., Левшакова В.Д., Татаринцева Т.А. Летний фитопланктон Среднего Каспия в период повышения уровня моря и в сравнении с предыдущими годами. Рыбохозяйственные исследования планктона. Часть 2. Каспийское море. М.: ВНИРО, 1991. С. 77–95.
26. Ардабьева А.Г., Татаринцева Т.А. Характеристика летнего фитопланктона Каспийского моря. Морские гидробиологические исследования. М.: ВНИРО, 2000. С. 22–38.
27. Кравчишина М.Д., Новигатский А.Н., Политова Н.В.,

- Зернова В.В., Мошаров С.А., Дара О.М., Ключиткин А.А. Исследование биогенной и абиогенной части взвеси дельты р. Волги в период весеннего половодья, май 2008 г. // *Водные ресурсы*. 2013. Т. 40. N 2. С. 151–164.
28. Moradi M. Comparison of the efficacy of MODIS and MERIS data for detecting cyanobacterial blooms in the southern Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*. 2014. Vol. 87. N 1-2. P. 311–322.
29. Marie D., Simon N., Vaultot D. Phytoplankton cell counting by flow cytometry // *Algal culturing techniques*. 2005. V. 1. P. 253–268.
30. Mukhanov V., Sakhon E., Rodionova N., Tsai A.Y. Vertical distribution of picophytoplankton in the NW shelf and deep-water area of the Black Sea in spring // *Journal of Marine System*. 2022. V. 234. P. 103–779.
31. Mukhanov V.S., Rylkova O.A., Churilova T.Y., Sakhon E.G., Pimenov N.V. Structure and seasonal trophodynamics of picophytoplankton in sevastopol bay and adjacent waters (the Black Sea) // *Microbiology*. 2016. V. 85. N 5. P. 553–561.
32. Багаев А.В., Дивинский Б.В., Зацепин А.Г., Кондратьев С.И., Островский А.Г., Щука С.А. Локальные изменения физико-биологических параметров поверхностных вод Севастопольской бухты под влиянием ливневого стока // *Морской гидрофизический журнал*. 2022. Т. 38. N 2 (224). С. 165–184.
33. Gasol J.M., Del Giorgio P.A. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities // *Scientia Marina*. 2000. V. 64. N 2. P. 197–224.
34. Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaultot D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I // *Applied and environmental microbiology*. 1997. V. 63. N 1. P. 186–193.
35. Lebaron P., Servais P., Baudoux A.C., Bourrain M., Courties C., Parthuisot N. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry // *Aquatic Microbial Ecology*. 2002. V. 28. N 2. P. 131–140.
36. Servais P., Casamayor E.O., Courties C., Catala P., Parthuisot N., Lebaron P. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content // *Aquatic microbial ecology*. 2003. V. 33. N 1. P. 41–51.
37. OceanColorWeb. URL: <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov> (дата обращения: 22.05.2022)
38. Копелевич О.В., Салинг И.В., Вазюля С.В., Глуховец Д.И., Шеберстов С.В., Буренков В.И., Каралли П.Г., Юшманова А.В. Биооптические характеристики морей, омывающих берега западной половины России, по данным спутниковых сканеров цвета 1998–2017 гг. М.: ООО "ВАШ ФОРМАТ", 2018. 140 с.
39. Hammer Ø., Harper D.A.T. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaeontologia electronica*. 2001. V. 4. N 1. P. 1.
40. Latasa M., Morán X.A.G., Scharek R., Estrada M. Dynamics of phytoplankton groups in three contrasting situations of the open NW Mediterranean Sea revealed by pigment, microscopy, and flow cytometry analyses // *Progress in Oceanography*. 2022. V. 201. P. 102–737. <https://doi.org/10.1016/j.pcean.2021.102737>
41. Tett P., Walne A., Kennington K., Gowen R., Bresnan E., Carreira C., Collingridge K., Davidson K., Edwards M., Fernand L., Heal M., McKinney A., Milligan S., Paltriguera L., Whyte C. Picoplankton Nanoplankton LifeForms: theoretical basis and assessment of candidate lifeforms. 2022.
42. Peperzak L., Gollasch S., Bradie J., Vanden Byllaardt J., Stehouwer P.P., Ruiz G.M., David M. Comparing flow cytometry and microscopy in the quantification of vital aquatic organisms in ballast water // *Journal of Marine Engineering Technology*. 2020. V. 19. N 2. P. 68–77. <https://doi.org/10.1080/20464177.2018.1525806>
43. Salmi P., Mäki A., Mikkonen A., Puttonen V-M., Vuorio K., Tiitola M. Comparison of epifluorescence microscopy and flow cytometry in counting freshwater picophytoplankton // *Boreal Env. Res*. 2021. V. 26. P. 17–27.
44. Mehrshad M., Amoozegar M.A., Ghai R., Shahzadeh Fazeli S.A., Rodriguez-Valera F. Genome reconstruction from metagenomic data sets reveals novel microbes in the brackish waters of the Caspian Sea // *Applied and environmental microbiology*. 2016. V. 82. P. 1599–1612.
45. Alexyuk M.S., Bukin Y.S., Butina T.V., Alexyuk P.G., Berezin V.E., Bogoyavlenski A.P. Viromes of Coastal Waters of the North Caspian Sea: Initial Assessment of Diversity and Functional Potential // *Diversity*. 2023. V. 15. N 7. P. 813.
46. Гусейнов М.К., Гасанова А.Ш., Гусейнов К.М., Хлопкова М.В. К изучению видового разнообразия фитопланктона среднего Каспия // *Вестник Дагестанского научного центра РАН*. 2019. Т. 75. С. 11–17.
47. Šantić D., Krstulović N., Šolić M., Ordulj M., Kušpilić G. Dynamics of prokaryotic picoplankton community in the central and southern Adriatic Sea (Croatia) // *Helgoland Marine Research*. 2013. V. 67. N 3. P. 471–481. <https://doi.org/10.1007/s10152-012-0336-x>
48. Thyssen M., Lefèvre D., Caniaux G., Ras J., Fernández C.I., Denis M. Spatial distribution of heterotrophic bacteria in the northeast Atlantic (POMME study area) during spring 2001. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 2005. V. 110. N C7. <https://doi.org/10.1029/2004JC002670>

REFERENCES

- Vostokov S.V., Kurashov E.A., Kur'yanova O.Yu., Tsel'movich O.L., Dmitriev A.V., Ostrovskii D.I., Kovalev M.Yu. Phytoplankton of the Middle Caspian: analysis of community structure changes over recent decades. *South of Russia: ecology, development*, 2022, vol. 17, no. 3, pp. 112–124. (In Russian) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2022-3-112-124>
- Vostokov S.V., Lobkovskii L.I., Vostokova A.S., Solov'ev D.M. Seasonal and long-term variability of phytoplankton in the Black Sea according to remote sensing data and contact measurements of chlorophyll a. *Reports of the Academy of Sciences*, 2019, vol. 485, no. 1, pp. 99–103. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S0869-5652485199-103>
- Vostokov S.V., Pautova L.A., Sahling I.V., Vostokova A.S., Gadzhiev A.A., Petherbridge G., Lobachev E.N., Abtahi B., Shojaei M.G. Seasonal and Long-Term Phytoplankton Dynamics in the Middle Caspian According to Satellite Data and In Situ Observations in the First Decades of the 21st Century. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2023, vol. 9, no. 11, pp. 957. <https://doi.org/10.3390/jmse11050957>
- Pautova L.A., Kravchishina M.D., Vostokov S.V., Zatsepin A.G., Klyuyvitkin A.A., Ostrovskii A.G., Flint M.V. Features of the vertical structure of summer phytoplankton in the deep-water areas of the Caspian Sea. *Doklady RAN* [Reports of the Russian Academy of Sciences]. 2015, vol. 462, no. 4, pp. 479–483. (In Russian)
- Vostokov S.V., Saling I.V., Vostokova A.S., Gadzhiev A.A., Lobachev E.N., Abtahi B., Shozai M.G. Study of seasonal and long-term variability of chlorophyll "a" in the Caspian Sea based on remote sensing data. *Reports of the Russian Academy of Sciences. Earth Sciences*, 2023, vol. 509, no. 1, pp. 134–140. (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S2686739722602770>
- Chen J.L., Pekker T., Wilson C.R., Tapley B.D., Kostianoy A.G., Cretaux J.-F., Safarov E.S. Long-term Caspian Sea level change. *Geophysical Research Letters*, 2017, vol. 44, pp. 6993–7001. <https://doi.org/10.1002/2017GL073958>
- Sapozhnikov V.V., Mordasova N.V., Metreveli M.P. Transformation of the Caspian Sea ecosystem during lowering and rising of the level. *Okeanologiya* [Oceanology]. 2010, vol. 50, no. 4, pp. 524–533. (In Russian)
- Vostokov S.V., Gadzhiev A.A., Vostokova A.S., Rabazanov N.I.

- Ctenophore *Beroe cf. ovata* in the Caspian Sea. The beginning of a new stage in the evolution of the Caspian ecosystem? *South of Russia: ecology, development*, 2020, vol. 15, no. 4, pp. 21–35. (In Russian) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-4-21-35>
9. Vostokov S.V., Gadzhiev A.A., Lobachev E.N., Vostokova A.S., Rabazanov N.I., Barkhalov R.M., Sapozhnikov F.V., Abtakhii B., Shozai M.G. Development and interaction of ctenophore populations *Beroe ovata* Bruguière, 1789 and *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 in the coastal zone of the Middle Caspian. *South of Russia: ecology, development*, 2022, vol. 17, no. 4, pp. 8–15. (In Russian) <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2022-4-8-15>
10. Zimina T.N., Ardab'eva A.G., Kotel'nikov A.V. Characteristics of the current state of phytoplankton invaders of the Caspian Sea. *Vodnoe khozyaistvo Rossii: problemy, tekhnologii, upravlenie* [Water Management in Russia: Problems, Technologies, Management]. 2022, no. 3, pp. 101–110. (In Russian)
11. Shakirova F.M. [Invaders of the Caspian Sea - a threat to the biodiversity of its ecosystem]. In: Problemy sokhraneniya ekosistemy Kaspiya v usloviyakh osvoeniya neftegazovykh mestorozhdenii [Problems of preserving the Caspian ecosystem in the conditions of oil and gas field development]. Astrakhan, 2019, pp. 191–196. (In Russian)
12. Zarbaliyeva T.S., Akhundov M.M., Kasimov A.M., Nadirov S.N., Guseinova G.G. Impact of invasive species on the native fauna of the Caspian Sea in the coastal waters of Azerbaijan. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii* [Russian Journal of Biological Invasions]. 2016, no. 2, pp. 33–48. (In Russian)
13. Pautova L.A., Kravchishina M.D., Silkin V.A., Lisitsyn A.P. The phenomenon of mass development of the invasive potentially toxic dinoflagellate *Gonyaulax polygramma* in the deep-water areas of the Caspian Sea. Reports of the Russian Academy of Sciences, 2017, vol. 474, no. 2, pp. 657–661. (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S1028334X17060071>
14. Ardab'eva A.G., Tatarintseva T.A. *Kharakteristika letnego fitoplanktona Kaspiiskogomorya* [Characteristics of summer phytoplankton of the Caspian Sea]. In: Morskoe gidrobiologicheskoe issledovaniya [Marine Hydrobiological Research]. Moscow, VNIRO Publ., 2000, pp. 22–38. (In Russian)
15. Pautova L.A., Kravchishina M.D., Silkin V.A., Klyuvitkin A.A., Artem'ev V.A., Vazyulya S.V., Burenkov V.I. Diatom species - invaders in the autumn phytoplankton of the Caspian Sea: role in the formation of total biomass and distribution in the salinity field. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii* [Russian Journal of Biological Invasions]. 2022, vol. 15, no. 2, pp. 68–82. (In Russian)
16. Kosarev A.N. Physico-Geographical Conditions of the Caspian Sea. The Caspian Sea Environment. The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin, Heidelberg, Springer, 2005, vol. 5, pp. 5–31. <https://doi.org/10.1007/6985002>
17. Kun M.S. *Plankton Kaspiiskogo morya v usloviyakh zaregulirovaniya stoka Volgi* [Plankton of the Caspian Sea under conditions of regulation of the Volga flow]. In: Izmenenie biologicheskikh kompleksov Kaspiiskogo morya za poslednie desyatletiya [Changes in biological complexes of the Caspian Sea over recent decades]. Moscow, Nauka Publ., 1965, pp. 54–97. (In Russian)
18. Proshkina-Lavrenko A.I., Makarova I.V. *Vodorosli planktona Kaspiiskogo morya* [Algae of the plankton of the Caspian Sea]. Leningrad, Nauka Publ., 1968, 291 p. (In Russian)
19. Babaev G.B. *Sostav i raspredelenie fitoplanktona v Srednem i Yuzhnom Kaspii* [Composition and distribution of phytoplankton in the Middle and Southern Caspian]. In: *Biologiya Srednego i Yuzhnogo Kaspiya* [Biology of the Middle and Southern Caspian]. Moscow, Nauka Publ., 1968, pp. 50–63. (In Russian)
20. Levshakova V.D. [Some ecological features of the phytoplankton of the Northern Caspian]. In: *Trudy Kaspiiskogo* [Proceedings of Caspiirkh]. 1971, vol. 26, pp. 67–82. (In Russian)
21. Levshakova V.D., Sanina L.V. [Summer phytoplankton of the Middle Caspian before and after the introduction of *Rhizosolenia*]. In: *Trudy VNIRO* [Proceedings of VNIRO]. 1973, vol. 80, pp. 18–27. (In Russian)
22. Levshakova V.D. *Fitoplankton* [Phytoplankton]. In: *Kaspiiskoe more. Fauna i biologicheskaya produktivnost'* [The Caspian Sea. Fauna and biological productivity]. Moscow, Nauka Publ., 1985, pp. 23–54. (In Russian)
23. Salmanov M.A. *Rol' mikroflory i fitoplanktona v produkcionnykh protsessakh Kaspiiskogo morya* [The role of microflora and phytoplankton in the production processes of the Caspian Sea]. Moscow, Nauka Publ., 1987, 214 p. (In Russian)
24. Borodin V.E. *Letnii fitoplankton raznykh razmernykh grupp Srednego i Yuzhnogo Kaspiya* [Summer phytoplankton of different size groups of the Middle and Southern Caspian]. In: *Rybkhozyaistvennye issledovaniya planktona. Chast' 2. Kaspiiskoe more* [Fisheries research of plankton. Part 2. The Caspian Sea]. Moscow, VNIRO Publ., 1991, pp. 102–110. (In Russian)
25. Sanina L.V., Levshakova V.D., Tatarintseva T.A. *Letnii fitoplankton Srednego Kaspiya v period povysheniya urovnya morya i v sravnenii s predydushchimi godami* [Summer phytoplankton of the Middle Caspian during the period of sea level rise and in comparison with previous years]. In: *Rybkhozyaistvennye issledovaniya planktona. Chast' 2. Kaspiiskoe more* [Fisheries research of plankton. Part 2. The Caspian Sea]. Moscow, VNIRO Publ., 1991, pp. 77–95. (In Russian)
26. Ardab'eva A.G., Tatarintseva T.A. *Kharakteristika letnego fitoplanktona Kaspiiskogo morya* [Characteristics of summer phytoplankton of the Caspian Sea]. In: *Morskoe gidrobiologicheskoe issledovaniya* [Marine hydrobiological research]. Moscow, VNIRO Publ., 2000, pp. 22–38. (In Russian)
27. Kravchishina M.D., Novigatskii A.N., Politova N.V., Zernova V.V., Mosharov S.A., Dara O.M., Klyuvitkin A.A. Investigation of the biogenic and abiogenic part of the suspension of the Volga River delta during the spring flood, May 2008. *Vodnye resursy* [Water resources]. 2013, vol. 40, no. 2, pp. 151–164. (In Russian)
28. Moradi M. Comparison of the efficacy of MODIS and MERIS data for detecting cyanobacterial blooms in the southern Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*. 2014, vol. 87, no. 1-2, pp. 311–322.
29. Marie D., Simon N., Vault D. Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques*, 2005, vol. 1, pp. 253–268.
30. Mukhanov V., Sakhon E., Rodionova N., Tsai A.Y. Vertical distribution of picophytoplankton in the NW shelf and deep-water area of the Black Sea in spring. *Journal of Marine Systems*, 2022, vol. 234, pp. 103–779.
31. Mukhanov V.S., Rylkova O.A., Churilova T.Y., Sakhon E.G., Pimenov N.V. Structure and seasonal trophodynamics of picophytoplankton in Sevastopol bay and adjacent waters (the Black Sea). *Microbiology*, 2016, vol. 85, no. 5, pp. 553–561.
32. Bagaev A.V., Divinskii B.V., Zatsepin A.G., Kondrat'ev S.I., Ostrovskii A.G., Shchuka S.A. Local changes in physico-biological parameters of surface waters of Sevastopol Bay under the influence of storm runoff. *Morskoi gidrofizicheskii zhurnal* [Marine Hydrophysical Journal]. 2022, vol. 38, no. 2 (224), pp. 165–184. (In Russian)
33. Gasol J.M., Del Giorgio P.A. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, 2000, vol. 64, no. 2, pp. 197–224.
34. Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vault D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain

- SYBR Green I. *Applied and environmental microbiology*, 1997, vol. 63, no. 1, pp. 186–193.
35. Lebaron P., Servais P., Baudoux A.C., Bourrain M., Courties C., Parthuisot N. Variations of bacterial-specific activity with cell size and nucleic acid content assessed by flow cytometry. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, vol. 28, no. 2, pp. 131–140.
36. Servais P., Casamayor E.O., Courties C., Catala P., Parthuisot N., Lebaron P. Activity and diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content. *Aquatic microbial ecology*, 2003, vol. 33, no. 1, pp. 41–51.
37. OceanColorWeb. Available at: <https://oceancolor.gsfc.nasa.gov> (accessed 22.05.2022)
38. Kopelevich O.V., Saling I.V., Vazyulya S.V., Glukhovets D.I., Sheberstov S.V., Burenkov V.I., Karalli P.G., Yushmanova A.V. Bioopticheskie kharakteristiki morei, omyvayushchikh berega zapadnoi poloviny Rossii, po dannym sputnikovykh skanerov tsveta 1998-2017 gg [Bio-optical characteristics of the seas washing the shores of the western half of Russia, according to satellite color scanners 1998-2017]. Moscow, LLC "VASH FORMAT" Publ., 2018, 140 p. (In Russian)
39. Hammer Ø., Harper D.A.T. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 2001, vol. 4, no. 1, p. 1.
40. Latasa M., Morán X.A.G., Scharek R., Estrada M. Dynamics of phytoplankton groups in three contrasting situations of the open NW Mediterranean Sea revealed by pigment, microscopy, and flow cytometry analyses. *Progress in Oceanography*, 2022, vol. 201, pp. 102–737. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2021.102737>
41. Tett P., Walne A., Kennington K., Gowen R., Bresnan E., Carreira C., Collingridge K., Davidson K., Edwards M., Fernand L., Heal M., McKinney A., Milligan S., Paltriguera L., Whyte C. Picoplankton Nanoplankton LifeForms: theoretical basis and assessment of candidate lifeforms. 2022.
42. Peperzak L., Gollasch S., Bradie J., Vanden Byllaardt J., Stehouwer P.P., Ruiz G.M., David M. Comparing flow cytometry and microscopy in the quantification of vital aquatic organisms in ballast water. *Journal of Marine Engineering Technology*, 2020, vol. 19, no. 2, pp. 68–77. <https://doi.org/10.1080/20464177.2018.1525806>
43. Salmi P., Mäki A., Mikkonen A., Pupponen V-M., Vuorio K., Tiola M. Comparison of epifluorescence microscopy and flow cytometry in counting freshwater picophytoplankton. *Boreal Environmental Research*, 2021, vol. 26, pp. 17–27.
44. Mehrshad M., Amoozegar M.A., Ghai R., Shahzadeh Fazeli S.A., Rodriguez-Valera F. Genome reconstruction from metagenomic data sets reveals novel microbes in the brackish waters of the Caspian Sea. *Applied and environmental microbiology*, 2016, vol. 82, pp. 1599–1612.
45. Alexyuk M.S., Bukin Y.S., Butina T.V., Alexyuk P.G., Berezin V.E., Bogoyavlenski A.P. Viromes of Coastal Waters of the North Caspian Sea: Initial Assessment of Diversity and Functional Potential. *Diversity*, 2023, vol. 15, no. 7, p. 813.
46. Guseinov M.K., Gasanova A.Sh., Guseinov K.M., Khlopkova M.V. On the study of species diversity of phytoplankton in the Middle Caspian. *Vestnik Dagestanskogo nauchnogo tsentra RAN* [Bulletin of the Dagestan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]. 2019, vol. 75, pp. 11–17. (In Russian)
47. Šantić D., Krstulović N., Šolić M., Ordulj M., Kušpilić G. Dynamics of prokaryotic picoplankton community in the central and southern Adriatic Sea (Croatia). *Helgoland Marine Research*, 2013, vol. 67, no. 3, pp. 471–481. <https://doi.org/10.1007/s10152-012-0336-x>
48. Thyssen M., Lefèvre D., Caniaux G., Ras J., Fernández C.I., Denis M. Spatial distribution of heterotrophic bacteria in the northeast Atlantic (POMME study area) during spring 2001. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2005, vol. 110, no. C7. <https://doi.org/10.1029/2004JC002670>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Сергей В. Востоков собрал и обработал полевые данные, проанализировал результаты, написал рукопись статьи. Владимир С. Муханов подготовил обзор литературы по проблеме исследования, провел вычисления, доработал текст, представил данные, подготовил текст статьи. Татьяна В. Рауэн провела проточную цитометрию, изучила теоретическую часть темы исследования, подготовила текст статьи. Анастасия С. Востокова собрала, обработала и проанализировала полевые данные, подготовила иллюстрации, участвовала в написании рукописи. Евгений Н. Лобачев собрал и обработал полевые данные. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата и других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Sergey V. Vostokov collected material and processed field data, undertook analysis of results and writing the article. Vladimir V. Mukhanov review the literature on the research topic, performed computations, finalized the text and prepared the article for submission to the Editortext preparation. Tatiana V. Rauen carried out flow cytometry, undertook theoretical study of literature on the research topic and prepared the text of the article. Anastasia S. Vostokova undertook collection and analysis of remote data, prepared the illustrations and participated in writing the article. Evgeny N. Lobachev undertook collection and processing of field data. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Владимир С. Муханов / Vladimir V. Mukhanov <https://orcid.org/0000-0002-5324-045X>
 Татьяна В. Рауэн / Tatiana V. Rauen <https://orcid.org/0000-0002-6757-7491>
 Сергей В. Востоков / Sergey V. Vostokov <https://orcid.org/0000-0002-0754-9325>
 Анастасия С. Востокова / Anastasia S. Vostokova <https://orcid.org/0000-0002-8547-3776>
 Евгений Н. Лобачев / Evgeny N. Lobachev <https://orcid.org/0000-0001-7688-8454>