



УДК-579:26/.27:576.3:57.087

Е. С. Соломонова, аспирант, **В. С. Муханов**, канд. биол. наук, с.н.с.

Институт биологии южных морей им А.О.Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь

ОЦЕНКА ДОЛИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК В НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* И *NITZSCHIA SP.* С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Изучение соотношения физиологически активных (живых) и неактивных (мёртвых) клеток в моновидовых накопительных культурах морских диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia sp.* с помощью проточной цитометрии показало, что по мере старения культур снижались внутриклеточное содержание хлорофилла и ферментативная активность, увеличивалось количество мёртвых клеток. Выход культур в стационарную фазу наблюдали через 4 сут. – у *Nitzschia sp.*, и 15 сут. – у *P. tricornutum*. В экспоненциальной фазе роста доля мёртвых клеток не превышала 10% в обеих культурах, тогда как в стационарной фазе она возрастала почти до 100 % у *Nitzschia sp.* и 70 % – у *P. tricornutum*. Апробированный метод может применяться для определения доли живых клеток в природных популяциях обоих исследованных видов.

Ключевые слова: жизнеспособность микроводорослей, проточная цитометрия, диацетат флуоресцеина, ферментативная активность, фермент эстераза

Под жизнеспособностью – одной из интегральных характеристик любой живой системы, обычно подразумевают способность организмов (или популяций) к росту и воспроизводству [2], что, в свою очередь, может свидетельствовать об их генетической и фенотипической полноценности [1]. Один из путей оценки жизнеспособности одноклеточных организмов – определение доли живых и мёртвых клеток в популяции (или любой суспензии клеток). Этот показатель широко используется как для контроля биотехнологических процессов [10, 14, 15], в частности, в лабораторном и промышленном культивировании микроводорослей, так и в исследованиях функциональной активности микробных популяций в природных условиях, например, для оценки степени загрязнения морских вод [5, 7, 10], мониторинга цветения микроорганизмов фитопланктона, в том числе токсичных видов [9, 13], оценки скорости роста и продуктивности фитопланктона [8, 19, 20].

В исследованиях культур микроводорослей и природного фитопланктона для маркирования живых клеток [5, 18] широко применяется диацетат флуоресцеина (FDA), в состав которого входит суб-

страт, специфичный к ферментам группы эстераз [8]. FDA является маркером ферментативной активности в живых клетках, а интенсивность его флуоресценции пропорциональна физиологической активности каждой из исследуемых клеток [6]. Такой «индивидуальный подход» в окраске FDA оказался исключительно эффективен в проточной цитометрии микроводорослей. Этим и объясняется быстрый рост числа работ, в которых окраску FDA комбинировали с проточной цитометрией для точного определения доли физиологически активных клеток в фитопланктоне [16]. Перспективность этого подхода связана, в первую очередь, с высокой производительностью и точностью проточной цитометрии. Вместе с тем, автоматизация цитометрических исследований сложных по своему составу сообществ микроводорослей предъявляет более высокие требования к подготовке проб, условиям окраски и проведения измерений. Среди малоизученных вопросов – насколько отличаются оптимальные условия окраски разных видов микроводорослей, и каким образом таксономический состав микроорганизмов в пробе может влиять на эффективность её окрашивания.

Целью данной работы был выбор оптимальных условий: а) окраски FDA двух видов диатомовых микроводорослей, *Phaeodactylum tricorutum* и *Nitzschia sp.* б) последующего определения доли физиологически активных клеток с помощью проточной цитометрии. Динамику соотношения физиологически активных и неактивных клеток исследовали в экспериментах с моновидовыми накопительными культурами этих микроводорослей в период роста, в стационарной стадии и стадии отмирания клеток.

Материал и методы. Моновидовые неаксе-ничные культуры диатомовых водорослей *Phaeo-*

dactylum tricorutum и *Nitzschia sp.* из коллекции отдела экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей НАН Украины выращивали на среде f/2 [11, 12] в колбах объемом 500 мл при постоянном освещении люминесцентными лампами холодного свечения (Philips TLRS 20W/54765). Уровень освещения измеряли люксметром Ю-116, принимая 1 клк = 17,2 мкЕ м⁻² с⁻¹ [3] (табл. 1). Опыты ставили в 3 повторностях. Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали пробы объемом 3 мл.

Табл. 1 Условия выращивания накопительных культур микроводорослей
Table 1 Growth and experimental conditions for the batch microalgal cultures

Культура	T, °C	Освещённость, Е мкЕ м ⁻² с ⁻¹	Диапазон численности, 10 ³ мл ⁻¹	Продолжительность опыта, сут.
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	19	103,2	1-8	21
<i>Nitzschia sp.</i>	21	86	3-7	21

Для оценки доли физиологически активных клеток в культурах использовали диацетат флуоресцеина (FDA, максимумы возбуждения и эмиссии, соответственно, 494 и 518 нм). Рабочий раствор красителя готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) (конечная концентрация 5 мг мл⁻¹) и хранили при +4°C в замороженном состоянии (температура плавления DMSO +18.5°C). Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с [8] – после оттаивания красителя при комнатной температуре его медленно добавляли в интенсивно перемешиваемую пробу в количестве 1 мкл мл⁻¹. Окраску производили в темноте в течение 20 мин (для выбора оптимального времени предварительно проводили тестовые окраски от 3 до 55 мин). Неокрашенные и окрашенные FDA пробы культур исследовали с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения СХР.

Общую численность микроводорослей определяли в кластере на 2-параметрических цитограммах по прямому светорассеиванию (FS) и флуоресценции отдельных клеток в красной области спектра (FL4) на безразмерных логарифмических шкалах. Концентрацию клеток рассчитывали по скорости потока пробы (60 мкл мин⁻¹), времени счёта (100 – 360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (минимум

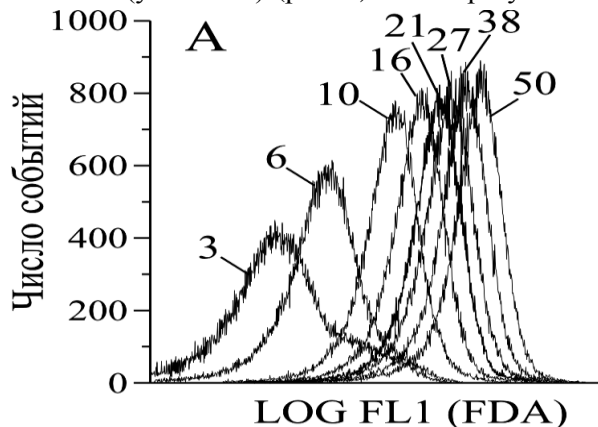
3000 кл. для каждой из проб). Контроль качества измерений производили с помощью калибровочных флуоросфер (Flow-Check™, Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

Ферментативную активность и содержание пигментов в клетках оценивали на 2-параметрических цитограммах по флуоресценции FDA (канал FL1 в зелёной области спектра, 525 нм) и автофлуоресценции (FL4 в красной области спектра, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. По положению кластера точек на цитограмме культуры в активной фазе роста определили 4 сектора, соответствующие живым и физиологически активным клеткам (FL1⁺); малоактивным и мёртвым клеткам (FL1⁻); клеткам с высоким (FL4⁺) и низким (FL4⁻) содержанием пигментов, и исследовали их динамику в ходе экспериментов.

Результаты и обсуждение. С увеличением продолжительности окрашивания проб FDA интенсивность флуоресценции клеток возрастала (смещение пика вдоль оси абсцисс на рис. 1), а её вариабельность снижалась (более высокий и узкий пик). После 10 мин окрашивания характер флуоресценции водорослей менялся незначительно, за исключением небольшого роста пика у *P. tricorutum* (рис.1, А) и его смещения у *Nitzschia sp.* (рис.1, Б). При продолжительности окраски более 50 мин

оценки численности FDA клеток оказывались завышенными, вероятно, за счёт неспецифической окраски мёртвых клеток. Таким образом, требовалась стандартизация процедуры окрашивания обеих культур для того, чтобы обеспечить корректное сопоставление результатов, полученных на разных этапах эксперимента.

Оптимальное время окрашивания обеих культур составило около 20 мин, поскольку при этом достигалась максимальная интенсивность окраски клеток (пик смещен вправо достаточно далеко, чтобы избежать недооценки окрашенных клеток) и её наименьшая вариабельность (узкий пик) (рис. 1). Наши результа-



ты хорошо согласуются с опубликованным [17] протоколом 20-минутной окраски FDA разных видов микроводорослей для их исследования с помощью эпифлуоресцентной микроскопии. Вместе с тем, нет полной уверенности в том, что методы окраски моновидовых культур окажутся столь же эффективными и в цитометрическом исследовании природного фитопланктона [4]. Тем не менее, предварительные результаты применения нашего протокола окраски проб морского фотоавтотрофного пико- и наннопланктона оказались успешными (собств. неопубл. данные).

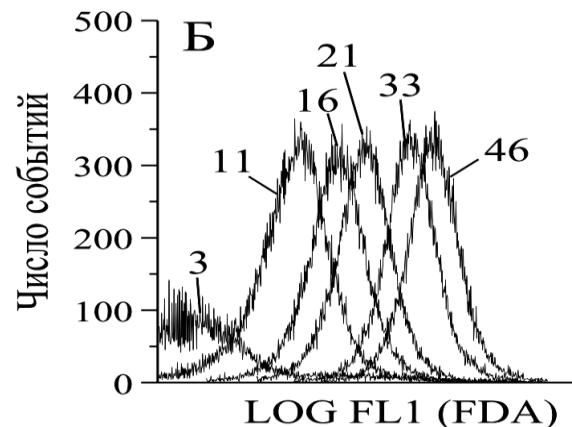


Рис. 1 Зависимость интенсивности и характера окраски микроводорослей от её продолжительности (время указано в минутах) в культурах *Phaeodactylum tricornutum* (А) и *Nitzschia* sp. (Б)

Fig. 1 Dependence of the culture fluorescence patterns on the duration of staining (the values are in minutes) in the cultures of *Phaeodactylum tricornutum* (А) and *Nitzschia* sp. (Б)

По мере старения культур снижалось внутриклеточное содержание пигментов (накопление FL4⁻) и ферментативная активность (FL1⁻), увеличивалось количество мёртвых клеток (смещение кластеров вниз и влево, рис. 2). Выход культур в стационарную фазу наблюдали через 4 сут. – у *Nitzschia* sp. и 15 сут. – у *P. tricornutum* (рис. 3). В экспоненциальной фазе роста доля мёртвых (FL1⁻) клеток не превышала 10 % в обеих культурах, тогда как в стационарной фазе она возрастала почти до 100 % у *Nitzschia* sp. и 70 % – у *P. tricornutum* (рис. 3). На 15-е сутки культура *Nitzschia* sp. переходила в стадию отмирания, и доля FL⁻ в общей численности микроводорос-

лей снижалась в результате лизиса мёртвых клеток.

Таким образом, оба исследованных вида показали удовлетворительные результаты окраски FDA, и, следовательно, этот метод может быть использован для определения доли живых клеток в их природных популяциях. Вместе с тем, необходимо учитывать, что он пока далёк от совершенства. Список видов морского фитопланктона, которые тестировались подобным образом, невелик [16], но позволяет сделать вывод о том, что окраска FDA не всегда эффективна. Для некоторых видов и даже групп микроводорослей (например, диатомовых) получены плохо воспроизводимые и случайные результаты [4, 16, 18]. *P. tricornutum* тестировали в пяти работах, включая нашу [4, 5, 16, 18]

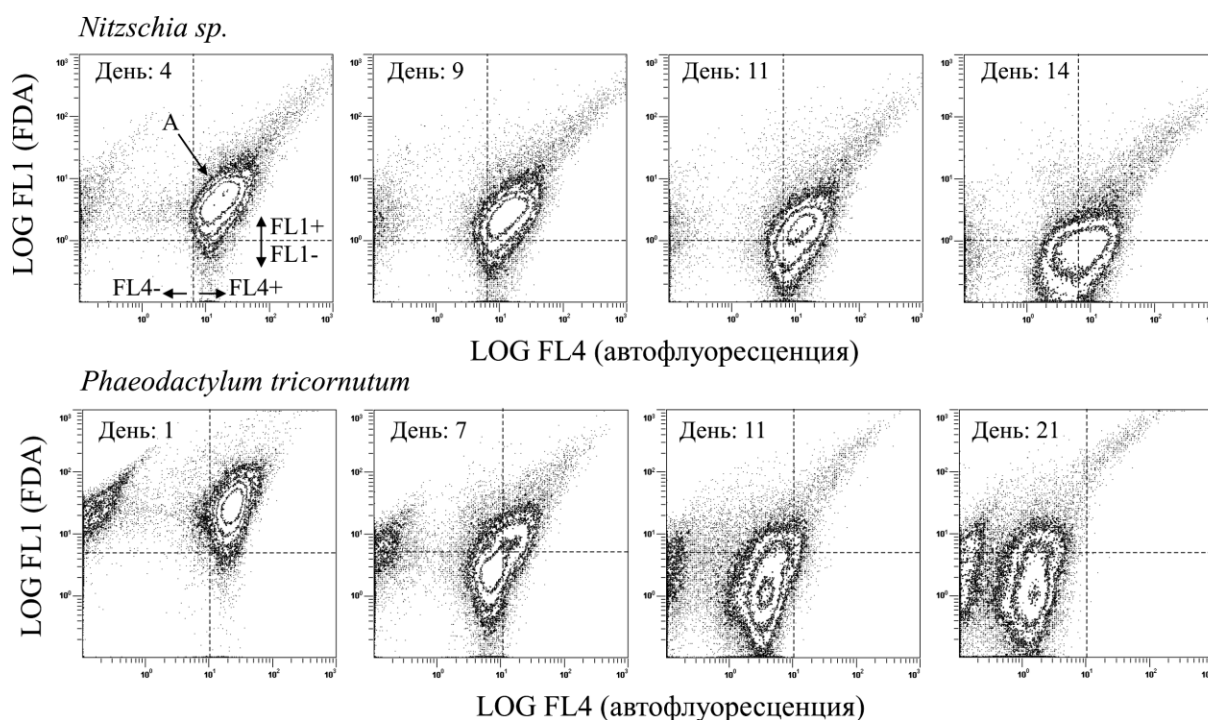


Рис. 2 Снижение ферментативной активности (FL1 – флуоресценция FDA) и содержания пигментов (FL4 – автофлуоресценция) в клетках культур микроводорослей. А – кластер, соответствующий культуре микроводорослей. Прерывистыми линиями обозначены границы четырёх субпопуляций клеток: живых и физиологически активных клеток (FL1+); малоактивных и мёртвых клеток (FL1-); клеток с высоким (FL4+) и низким (FL4-) содержанием пигментов

Fig. 2 Decrease in cell enzymatic activity (FL1 – FDA fluorescence) and pigment content (FL4 - autofluorescence) in the batch microalgal cultures. A – cluster of the cultured microalgae. Dashed lines differ four cell subpopulations: alive, physiologically active cells (FL1+); non-active and dead cells (FL1-); cells with high (FL4+) and low (FL4-) pigment content

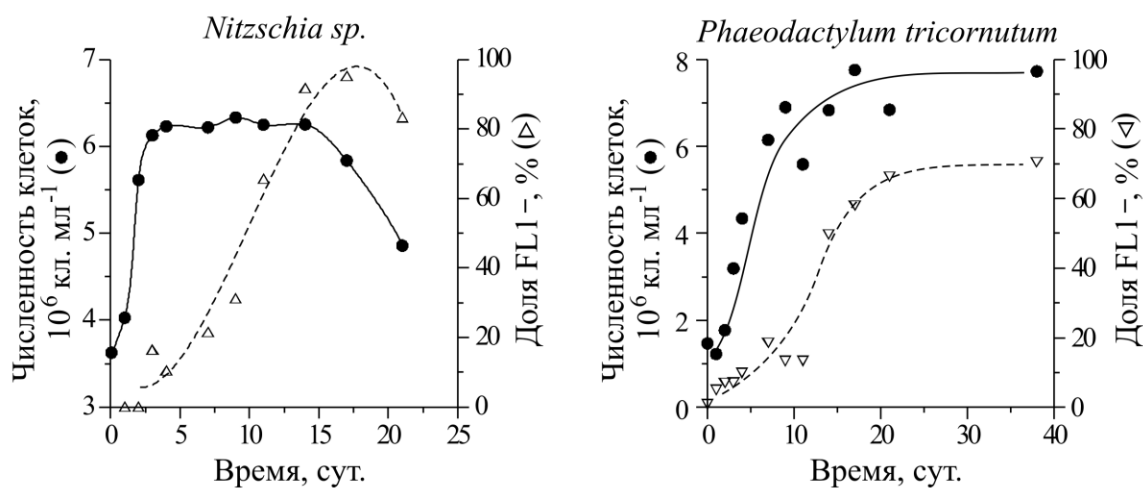


Рис. 3 Динамика общей численности и доли малоактивных и мёртвых клеток (FL1-) в накопительных культурах микроводорослей

Fig. 3 Dynamics of the total abundance and the percentage of the non-active and dead cells (FL1-) in the batch microalgal cultures

В трёх из них достоверные результаты не получены, что может указывать на некоторые неучтенные факторы, контролирующие гидролиз FDA в клетках. Чтобы прояснить этот вопрос, требуются дальнейшие исследования эффективности окраски FDA *P. tricornutum* и *Nitzschia* sp. как в природных пробах фитопланктона (с помощью эпифлуоресцентной микроскопии), так и в культурах, которые отличаются; а) происхождением; б) условиями поддержания; в) фазой роста и физиологическим состоянием клеток (с помощью микроскопии и проточной цитометрии).

1. Луста К. А., Фухте Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
2. Одум Ю. Экология. – М.: Мир, 1975. – 741 с.
3. Парсонс Т. Р., Такахаши М., Харгрейв Б. Биологическая океанография. – М.: Легкая промышленность, 1982. – 432 с.
4. Agustí S, Sánchez MC. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe. // *Limnol Oceanogr.* – 2002. – **47**. – P. 818 – 828.
5. Bentley-Mowat J. A. Application of fluorescence microscopy to pollution studies on marine phytoplankton. // *Bot. Mar.* – 1982. – **28**. – P. 203 – 204.
6. Brookes J. D., Geary S. M., Ganf G. G., Burch M. D. Use of FDA and flow cytometry to assess metabolic activity as an indicator of nutrient status in phytoplankton. // *Mar. Freshw. Res.* – 2000. – **51**. – P. 817 – 823.
7. Davey H. M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. // *Mic. Rev.* – 1996. – **60**, No. 4. – P. 641 – 696.
8. Dorsey J., Yentsch C. M., Mayo S., McKenna C. Rapid analytical technique for the assessment of cell activity in marine microalgae. // *Cytometry.* – 1989. – **10**. – P. 622 – 628.
9. Georgieva D. M., Kruleva M. M. Cytochemical investigation of long-term stored maize pollen. // *Euphytica.* – 1994. – **72**. – P. 87 – 94.
10. Gilbert F, Galgani F, Cadiou Y. Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. // *Mar Biol.* – 1992. – **112**. P. 199 – 205.
11. Guillard R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in “Culture of Marine Invertebrate Animals.” – USA: Plenum Press, 1975. – P. 26 – 60.
12. Guillard R.R.L., J.H. Ryther. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* and *Detonula confervacea* // *Can. J. Microbiol.* – 1962. – **8**. – P. 229 – 239.
13. Helson – Harrison J., Helson – Harrison Y., Shivanna K. R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. // *Theor. Appl. Genet.* – 1984. – **67**. – P. 367 – 375.
14. Jochem F. Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate. // *Mar Biol.* – 1999. – **135**. – P. 721 – 728.
15. Jones R. P. Measures of yeast and deactivation and their meaning. – *Process Biochemistry*, 1987. – P. 117 – 128.
16. Garvey M., Moriceau B., Passow U. Applicability of the FDA assay to determine the viability of marine phytoplankton under different environmental conditions. // *Mar Ecol Prog Ser.* – 2007. – **352**. – P. 17 – 26.
17. Masashi O., Tomoo S., Yoshio E. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. // *Cytometry* – 2000. – **51**, No. 3. – P. 153 – 157.
18. Onji M., Sawabe T., Ezura Y. An evaluation of viable staining dyes suitable for marine phytoplankton. // *Bull Fac Fish Hokkaido Univ.* – 2000. – **51**. – P. 151 – 158.
19. Veldhuis M. J. W, Kraay G. W., Timmermans K. R. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth. // *J. Phycol.* – 2001. – **36**. – P. 167 – 177.
20. Yentsch C. M. Flow Cytometry: Near real-time information about Ocean Biology. // *Oceanography.* – 1990. – **3**, No. 2. – P. 47 – 50.

Получено 23 августа 2010 г.

Оцінка частинки фізіологічно активних клітин у накопичувальних культурах *Phaeodactylum tricorutum* та *Nitzschia* sp. за допомогою проточної цитометрії. К. С. Соломонова, В. С. Муханов. Вивчення співвідношення фізіологічно активних (живих) і неактивних (мертвих) кліток в моновидових накопичувальних культурах морських діатомових водоростей *Phaeodactylum tricorutum* та *Nitzschia* sp. за допомогою проточної цитометрії показало, що у міру старіння культур знижувалися внутріклітинний вміст хлорофілу і ферментативна активність, збільшувалася кількість мертвих кліток. Вихід культур у стаціонарну фазу спостерігали через 4 доби – у *Nitzschia* sp. і 15 діб – у *P. tricorutum*. У експоненціальній фазі зростання частка мертвих кліток не перевищувала 10% в обох культурах, тоді як в стаціонарній фазі вона зростала майже до 100 % в *Nitzschia* sp. і 70 % – в *P. tricorutum*. Апробований метод може застосовуватися для визначення долі живих клітин у природних популяціях обох досліджених видів.

Ключові слова: життєздатність мікрободоростей, проточна цитометрія, діацетат флуоресцеїну, ферментативна активність, фермент естераза

Flow cytometry for the assessment of physiological active cells in batch cultures of *Phaeodactylum tricorutum* та *Nitzschia* sp. K. S. Solomonova, V. S. Mykhanov. Dynamics of the ratio between physiologically active (viable) and inactive (dead) cells was studied in monospecific batch cultures of the diatoms *Phaeodactylum tricorutum* и *Nitzschia* sp., using flow cytometry. Over the period of culture senescence, intracellular chlorophyll content and enzyme activity decreased while the number of dead cells increased. The cultures of *Nitzschia* sp. and *P. tricorutum* achieved the stationary phase in 4 and 15 days, respectively. In the exponential growth phase, contribution of dead cells to the total abundance did not exceed 10% in both the cultures while in the stationary phase, it rised up to 70 % in *P. tricorutum* and almost 100 % in *Nitzschia* sp. The approach approved can be successfully applied for estimating viable cell abundances in natural populations of the species.

Key words: Viability of microalgae, flow cytometry, fluorescein diacetate, enzyme activity, enzyme esterase.

ЗАМЕТКА

Находка редкой для Азовского моря *Moerisia maeotica* (Hydrozoa, Leptolida, Moerisiidae) у южного побережья о. Бирючий. [Знахідка рідкосної для Азовського моря *Moerisia maeotica* (Hydrozoa, Leptolida, Moerisiidae) біля південного узбережжя о. Бірючий.] The finding of rare *Moerisia maeotica* (Hydrozoa, Leptolida, Moerisiidae) near southern coast of island Birjuchij.] В августе 2010 г. в районе южной оконечности о. Бирючий на границе Утлюкского лимана и моря на мелководье был выполнен горизонтальный лов зоопланктона протяжённостью 100 м. Сеть профильтровала 5.7 м³ воды. В полученной пробе было обнаружено 285 медузоидных особей *Moerisia maeotica* (Ostr., 1896), т.е. 50 экз. м⁻³. Диаметр зонтика медуз колебался от 0.5 мм до 4.75 мм (в среднем 2.76). Рассчитанная средняя масса медузы по формуле $0.140 \cdot L^3$ (Виноградов, Шукшина, 1987), где L – диаметр зонтика, составила 2.943 мг, а общая биомасса 147.15 мг м⁻³. Температура воды в районе отбора пробы была 20°C, солёность – 9.08 ‰. *M. maeotica* имеет полипоидную и медузоидную стадию развития. Вид распространён в Азовском и Чёрном морях, солоноватоводных и значительно опреснённых водоёмах Азово-Черноморского бассейна, а также в опреснённых водоёмах бассейнов Средиземного и Эгейского морей (Наумов, 1960). После открытия Волго-Донского канала проник в Каспийское море (Наумов, 1968). В последние годы, благодаря загрязнению Азовского моря, повышению солёности в прибрежных акваториях, развитие данного вида резко сократилось, встречается единично (Поважний, 2009). Начиная со второй половины 1960-х годов медуза перестала встречаться в северо-западной части Чёрного моря (Александров, Полишук, 2006), что может быть следствием как загрязнения, так и эвтрофикации. Это послужило тому, что данный вид получил статус исчезающего и был занесён в Красную книгу Украины (Акимов, 2009). **В. Ю. Красновид**, вед. инж. (Одесский филиал Института биологии южных морей НАН Украины).