

УДК 582.26/27:576.3

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКИХ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ: РАЗВИТИЕ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2019 г. Ж. В. Маркина^{1, 2, *}

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

²Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690091, Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 08.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Метод проточной цитометрии более 30 лет успешно применяют для быстрой и качественной оценки физиологического состояния, химического состава и численности клеток микроводорослей, в том числе в исследованиях фитопланктона. В обзоре обсуждаются возможности этого метода в решении фундаментальных и прикладных задач, связанных с изучением микроводорослей; параметры основных флуоресцентных красителей, применяемых для данного метода; особенности микроводорослей как объектов исследования, а также сложности, связанные с использованием метода.

Ключевые слова: проточная цитометрия, одноклеточные водоросли, флуоресценция, биотехнология

DOI: 10.1134/S0134347519050073

Морские микроводоросли как первичные продуценты и основной источник кислорода для обитающих в воде животных всесторонне изучают на протяжении долгого периода. В настоящее время возросла их роль как объектов биотехнологии. Морские одноклеточные водоросли используют в качестве корма для нужд аквакультуры, как источник для получения биотоплива, противоопухолевых и анти-вирусных препаратов, антибиотиков, каротиноидов, фикоэритрина, омега-3 жирных кислот, белка и многих других веществ, а также как объекты биоремедиации. В связи с этим объемы культивирования микроводорослей ежегодно увеличиваются (Viganì et al., 2015; Named, 2016; Chew et al., 2017).

Чтобы точно оценить численность клеток водорослей, их физиологическое состояние и химический состав, необходим метод, обеспечивающий быстрое получение данных. Для мониторинга численности фитопланктона, проводимого в разных районах Мирового океана, также требуется точный экспресс-метод оценки. Среди множества способов решения этих задач все чаще применяют проточную цитометрию (ПЦ). Данный метод первоначально был разработан для анализа форменных элементов крови как лучшая альтернатива микроскопическому анализу (Sharigo, 2003). С 1970-х гг. его применяют не только для клинической диагностики, но и для решения таких фундаментальных научных задач, как определение пролиферативной активности клеток, анализ

содержания ДНК и параметров клеточного цикла (Picot et al., 2012). С 1980-х гг. этот метод используют и для исследования микроводорослей (Cunningham, Leftley, 1986; Jamers et al., 2009). Современная ПЦ базируется на всем арсенале методов флуоресцентного анализа компонентов клеток и происходящих в них процессов. Высокая производительность метода позволяет за одну минуту исследовать до тысячи и более клеток. В каждый момент времени через луч лазера проходит только одна клетка, благодаря чему регистрируются не усредненные характеристики клеточной популяции, а параметры отдельной клетки. Это дает возможность изучать конкретные популяции клеток, базируясь на выбранных стратегиях гейтирования с целью дальнейшего исследования конкретной популяции или проведения клеточного сортирования (Picot et al., 2012). Подробные сведения о клеточном сортировании клеток микроводорослей с необходимыми характеристиками приведены в работе Перейра с соавторами (Pereira et al., 2018).

Для проточно-цитометрического анализа необходим небольшой объем суспензии водорослей (около 70 мкл культуры на экспоненциальной фазе роста). Преимуществом этого метода является возможность оценки содержания от 100 клеток в 1 мл (Franklin et al., 2001; Eleršek, 2012; Chioccioli et al., 2014); имеется указание и на более низкий предел определения – 50 клеток (Børshheim et al., 1989). Благодаря использованию нескольких лазе-

ров и каналов детекции, существует возможность одновременно измерить несколько параметров. В настоящее время ПЦ стала рутинным методом для изучения микроводорослей; количество публикаций с ее использованием увеличивается с каждым годом, в то время как первый обзор по данной теме насчитывал всего 28 ссылок (Cunningham, Leftley, 1986). Более продвинутым вариантом метода является ПЦ с визуализацией, получившая широкое распространение для изучения популяций природного фитопланктона (Dashkova et al., 2017).

Цель настоящего обзора заключается в анализе накопленных данных по применению ПЦ для исследования морских одноклеточных водорослей в условиях лабораторной культуры и в природных популяциях.

Пробоподготовка одноклеточных водорослей к анализу методом проточной цитометрии

Подсчет численности клеток микроводорослей не требует какой-либо подготовки образца, главным условием, как и при работе с любыми другими объектами, является отсутствие агрегатов (Shapiro, 2003). Основная сложность метода, особенно для океанографических исследований, — сохранение образцов до момента их анализа. Для этого предлагались быстрая заморозка без добавления реактивов; медленная заморозка с добавлением глутаральдегида для образцов, содержащих в основном синезеленые водоросли; добавление глицерина с глутаральдегидом или только детергента Pluronic F68, а также добавление его совместно с глутаральдегидом (Marie et al., 2014). Известно, что глутаральдегид вызывает флуоресценцию, регистрируемую на длине волны 515–560 нм. Фиксация ацетоном, метанолом или этанолом приводит к изменению клеточной ультраструктуры и морфологии, к появлению дебриса и к уменьшению автофлуоресценции хлорофилла (Нука et al., 2013). Однако эти же авторы отмечают, что параформальдегид и формальдегид не оказывают негативные эффекты и незначительно снижают автофлуоресценцию хлорофилла. Очевидно, лучшим вариантом остается как можно более быстрый анализ образца (Koch et al., 2014).

Подсчет численности клеток

С помощью статистических методов неоднократно доказана хорошая корреляция между данными проточной цитометрии и подсчетом клеток под световым микроскопом (Børsheim et al., 1989; Stauber et al., 2005; Stauffer et al., 2008; Forget et al., 2010; Eleršek, 2012). Более того, автоматизированный процесс снижает количество возможных ошибок при подсчете (Jamers et al., 2009). Для упрощения оценки роста популяций микроводорослей в лаборатории и в условиях биотехнологического производства предложен спектрофотометрический метод определения оптической плотности суспензии клеток. Однако он имеет ряд ограничений,

поэтому данные, полученные с его помощью, не всегда корректны (Børsheim et al., 1989; Chioccioli et al., 2014; Günerken et al., 2017). Для контроля роста популяций неоднократно предлагалось использовать определение сухой массы. Недостатками этого метода являются зависимость массы от накопления веществ клетками и то, что соли, попадающие в пробу при анализе морских микроводорослей, искажают результаты измерений (Günerken et al., 2017). Таким образом, проточная цитометрия остается самым быстрым и точным методом по сравнению с другими методами, предложенными для оценки численности популяций микроводорослей.

Высокая скорость анализа позволяет быстро оценить профили распределения фитопланктона (Cunningham, Leftley, 1986). Так, ПЦ использовали для подсчета клеток *Chrysochromulina polylepsis* во время цветения (Børsheim et al., 1989). На основе данных по флуоресценции фотосинтетических пигментов и прямому/боковому светорассеянию, полученных с помощью ПЦ, показано распределение видов родов *Prochlorococcus* и *Synechococcus* по глубине в зависимости от факторов среды (van den Engh et al., 2017). С тех пор как ПЦ была адаптирована для океанографических исследований, этот метод применяют для быстрого и точного подсчета пикопланктона — клеток размером менее 2 мкм в диаметре, что невозможно сделать под световым микроскопом (Jochem, 2000).

Использование показателей прямого и бокового светорассеяния для изучения клеток одноклеточных водорослей

Проточные цитометры сконструированы так, что за счет гидродинамического фокусирования через луч лазера одновременно проходит одна клетка. Как только клетка пересекает луч источника света, детектор начинает регистрацию сигнала, который достигает максимума при попадании клетки в центр луча. Когда клетка покидает луч, сигнал исчезает. Проходящие через луч лазера клетки рассеивают свет под разными углами. Рассеяние света зависит от диаметра клетки и сложности ее внутренней структуры. Регистрация рассеянного света под малыми углами (до 19°, так называемое прямое светорассеяние) используется для определения относительного диаметра клетки (Shapiro, 2003). Это сигнал, определяемый как свет того же цвета, что и освещающий поток, т.е. показывающий способность отражать свет по сравнению с окружающей клетку жидкостью (Диагностика..., 2017). Для регистрации внутриклеточных структур используется боковое светорассеяние, при котором значительное количество света рассеивается под углом 90°. Использование этого параметра позволяет косвенно судить о внутриклеточных изменениях (Cunningham, Buonaccorsi, 1992; Shapiro, 2003). В целом процедура регистрации прямого и бокового светорассеяния микроводорослей не отличается от таковой для других типов клеток и не требует специальной

пробоподготовки, за исключением клеток в колониях, цепочках, пленках и т.д. (Нука et al., 2013). В первых исследованиях микроводорослей с помощью ПЦ использовали только показатели прямого и бокового светорассеяния (Cunningham, Leftley, 1986). В настоящее время данные параметры также применяются в альгологических исследованиях с помощью проточных цитометров (Jamers et al., 2009; Соломонова, Акимов, 2014; Esperanza et al., 2017; Seoane et al., 2017). Более того, Франклин с соавторами (Franklin et al., 2001) предложили использовать эти показатели в качестве обязательных параметров в токсикологических экспериментах. На прямое светорассеяние оказывает влияние индекс преломления частиц, проходящих через луч лазера, в результате этого более крупные клетки могут быть зарегистрированы как более мелкие и наоборот (Shapiro, 2003). Для точного определения размеров частиц применяются наборы калибровочных бусин с заданным диаметром. Индекс преломления (ИП) клеток водорослей составляет 1.41–1.43, поэтому для определения их размеров рекомендуется использовать бусы из кремния (ИП = 1.4), а не из полистирола (ИП = 1.9) (Chioccioli et al., 2014). Нарушение структуры поверхностной мембраны приводит к тому, что при одинаковом размере клеток проточный цитометр регистрирует мертвые клетки как более крупные, что связано с их менее ярким отраженным сигналом прямого светорассеяния по сравнению с таковым у живых клеток (Диагностика..., 2017).

Использование флуоресцентного анализа для изучения клеток одноклеточных водорослей

Флуоресценция обусловлена тем, что клеточные структуры взаимодействуют с красителями. Проточный цитометр собирает флуоресцентные сигналы в один или несколько каналов в соответствии с возбуждением лазера и длиной волны света, испускаемой флуорохромом (Диагностика..., 2017). Некоторые клетки, в том числе микроводоросли, способны к автофлуоресценции за счет содержащихся в них веществ (Shapiro, 2003). В настоящее время проточная цитометрия работает с огромным количеством флуоресцентных зондов, применяемых в зависимости от решаемой задачи и объекта исследования (Зурочка и др., 2014). Одновременная регистрация количества клеток и показателей физиологического состояния водорослей — необходимая составляющая оценки культур водорослей, так как численность клеток может оставаться неизменной при физиологических изменениях (Levy et al., 2007; Eleršek, 2012). Взаимодействие красителя со структурами клетки микроводорослей зависит от вида и отдела водоросли, но в пределах штаммов одного вида красители связываются со структурами клетки одинаково. В образцах природных вод содержится огромное количество видов, и проблема подбора красителей заключается в получении ложноотрицательных результатов, так как клетки некоторых видов

плохо окрашиваются или вовсе не окрашиваются (Peperzak, Brussaard, 2011).

Фотосинтетические пигменты. Особенностью одноклеточных водорослей как растительных организмов является присутствие хлорофилла *a*, обладающего выраженной флуоресценцией. Другим видам хлорофиллов свойственна слабая флуоресценция, которую не учитывают при анализе физиологического состояния. Флуоресценция дополнительных пигментов каротиноидов еще слабее, однако опубликованы сведения о выраженной флуоресценции β -каротина у *Dunaliella salina*, зарегистрированной с помощью конфокального микроскопа (Hejazi et al., 2004; Kleinegris et al., 2010). Присутствие фотосинтетических пигментов, способных флуоресцировать, с одной стороны, усложняет процедуру детекции и сужает спектр применяемых красителей, с другой стороны, дает преимущества в изучении физиологического состояния микроводорослей. Интенсивность флуоресцентного сигнала отчасти связана с количеством пигмента, содержащегося в клетке, но зависит и от ее физиологического состояния (Jamers et al., 2009; Forget et al., 2010). Измерение флуоресценции хлорофилла *a* интактных клеток позволяет получить информацию об абсорбции, распределении и утилизации энергии фотосинтеза (Franqueira et al., 2000). Однако известно, что флуоресценция хлорофилла *a* — самый нечувствительный показатель у микроводорослей при определении токсического действия веществ (Franklin et al., 2001). Для обеспечения более точной детекции флуоресценции красителей при работе с микроводорослями была предложена методика фотообесцвечивания фотосинтетических пигментов с помощью 24-часовой экспозиции суспензий на свету и экстракции пигментов (Yentsch et al., 1983). Предлагалось также экстрагировать хлорофилл смесью метанола и уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 (Hong et al., 2016). Однако эти методы не получили широкого распространения из-за несовместимости с витальными красителями и, вероятно, в связи с увеличением видов производимых красителей.

Автофлуоресценция позволяет отделить микроводоросли от детрита и других частиц как в культуре, так и в природных водах (Trask et al., 1982). В разных таксономических группах микроводорослей автофлуоресценция различается, поэтому по соотношению флуоресценции хлорофилла *a* к таковой фикозритрина и аллофиокцианина из общего числа водорослей можно выделить криптомонады, синезеленые и красные водоросли (Cunningham, Leftley, 1986; Günerken et al., 2017). Некоторые представители синезеленых настолько малы, что их сложно подсчитать под световым микроскопом, в этом случае ПЦ дает огромные возможности для оценки численности пикофитопланктона (Eleršek, 2012). На основе анализа соотношения пигментов с помощью ПЦ были обнаружены виды рода *Prochlorococcus* (Veldhuis, Kraay, 2000) и вид *Ostreococcus tauri* (Shapiro, 2003).

Этот метод был применен при изучении действия меди на природные сообщества фитопланктона, в которых преобладали представители рода *Synechococcus* (Debelius et al., 2009).

Исследование базовых показателей ПЦ (прямое светорассеяние, боковое светорассеяние и автофлуоресценция хлорофилла *a*) позволило обнаружить агрегирование частиц микропластика с клетками водорослей и выявить один из путей его миграции в экосистемах (Long et al., 2017). Совокупность базовых параметров используют и для оценки действия веществ на микроводоросли (Franqueira et al., 2000; Маркина, Айздайчер, 2018).

Анализ содержания нуклеиновых кислот и параметров клеточного цикла. Первым опытом использования ПЦ стал анализ таких внутриклеточных компонентов, как ДНК и РНК, что привело к разработке новых методов исследования параметров клеточного цикла (Зурочка и др., 2014). Изучение клеточного цикла микроводорослей с помощью ПЦ началось в 1980-е гг. (Vaulot et al., 1986). Используемые в этих исследованиях красители Hoechst 33343 и йодид пропидия востребованы и в настоящее время; их применяют также для определения соотношения живых и мертвых клеток (Зурочка и др., 2014). Известно более 80 красителей, связывающихся с ДНК и РНК. Для изучения природных популяций микроводорослей, как правило, используется SYBR Green, для лабораторных популяций микроводорослей применяются DAPI, SYTOX Green и йодид пропидия (Segovia, Berges, 2009; Zetsche, Meysman, 2012; Нука et al., 2013). Проблема с использованием последнего состоит в перекрывании спектра эмиссии с эмиссией фотосинтетических пигментов водорослей (Veldhuis et al., 2001), хотя его применяют в исследованиях с микроводорослями без указания на какие-либо затруднения, связанные с данным фактом (Cid et al., 1997; Franquiera et al., 2000; Marie et al., 2000; Князев и др., 2018). В качестве заменителя йодида пропидия рекомендован SYTOX Green (Veldhuis et al., 2001). Краситель DAPI разрабатывался как препарат, действующий на ДНК паразитов домашних животных, однако была обнаружена его флуоресценция при связывании с ДНК. Сложность использования DAPI обусловлена зависимостью взаимодействия этого красителя от конденсации хроматина, в свою очередь зависящей и от пробоподготовки. Красители линейки Hoechst обладают схожими спектральными свойствами и механизмами связывания с ДНК (Karusinski, 1995).

В альгологических исследованиях с помощью ПЦ сложность заключается в том, что при анализе параметров клеточного цикла коэффициент вариации (CV) полученных данных не должен превышать 5%, а это достигается не на всех морских водорослях. Особенно трудно работать в данном направлении с диатомовыми водорослями, по видимому, из-за наличия кремниевых створок (Figuroa et al., 2010; Mazálova et al., 2011). Количество ДНК, оцененное с помощью йодида пропидия,

применяется в качестве дополнительного показателя при определении видов родов *Alexandrium* и *Karlodinium* как в лабораторных, так и в полевых исследованиях (Figuroa et al., 2010), а также вида *Kohloidium polykrikoides* (Hong et al., 2016). Однако в клетках растительных организмов может содержаться более значительное количество ДНК, чем в клетках млекопитающих, что приводит к искажению результатов; кроме этого в клетках микроводорослей одного вида может быть разное количество ядер и содержание ДНК не всегда соотносится с фазой клеточного цикла (Trask et al., 1982). Вероятно, указанные обстоятельства — это одна из причин не столь активного использования данного метода в подобных исследованиях на микроводорослях. Тем не менее применение йодида пропидия позволило выявить нарушение клеточного цикла у *Thalassiosira weissflogii* и *Hymenomonas carterae* в условиях пониженной освещенности (Vaulot et al., 1986), а у *Proocentrum minimum* — при пониженной солености (Skarlato et al., 2018) и температурном стрессе (Князев и др., 2018).

Оценка активности ферментов. Известно, что активность ферментов пропорциональна интенсивности флуоресценции красителей, которая зависит от внутриклеточной концентрации детектируемых веществ, от количества красителя, проникшего в клетку и экскретировавшегося из нее, от времени и стандартных условий окрашивания (Зурочка и др., 2014).

Эстеразная активность — показатель, наиболее часто используемый для морских микроводорослей. Как правило, его определяют с применением флуоресцеин диацетата — ФДА (Нука et al., 2013). Этот краситель не обладает собственной флуоресценцией, но, проникнув в клетку, подвергается действию неспецифических эстераз, а продукт, полученный в результате его гидролиза, способен флуоресцировать (Зурочка и др., 2014). Первоначально краситель был разработан для дифференциации метаболически активных бактерий в разных средах (Jochem, 2000). Для морских микроводорослей ФДА впервые использовали Дорси с соавторами (Dorsey et al., 1989). В то же время на *Chlorella vulgaris* f. *suboblunga* установлено, что флуоресценция ФДА как показатель ферментативной активности не коррелирует с функциональными изменениями, связанными с возрастом культуры и скоростью ее роста, если при этом не наблюдается необратимой деструкции клеток. Следовательно, этот показатель может служить только для выявления живых и мертвых клеток в популяции, но не для оценки их метаболической активности (Peperzak, Brussaard, 2011; Соломонова, Акимов, 2012), а протоколы исследований требуют доработки. ФДА может быстро покидать клетку, а также вызывать ее гибель, поэтому разработаны другие красители, связывающиеся с эстеразами: Calcein-Am и CMFDA (Cell Tracker Green), которые характеризуются более яркой, чем ФДА, флуоресценцией (Peperzak, Brussaard,

2011). Исследование 24 видов морских водорослей разных отделов показало, что *Dunaliella tertiolecta*, *Amfidinium carterae* и *Synechococcus elongatus* не окрашиваются ФДА, а для некоторых независимо от таксономической принадлежности получены ложнопозитивные и ложнонегативные результаты (MacIntyre, Cullen, 2016). Несмотря на вышеизложенное, ФДА часто используют в альгологических исследованиях, например, для оценки состояния микроводорослей в культурах и токсикологических опытах (Нюка et al., 2013), а также для изучения природного фитопланктона (Соломонова, 2016).

Содержание липидов. Определение содержания липидов методом проточной цитометрии имеет преимущества в скорости определения и соответствует данным, полученным с помощью других методов, что подтверждено на разных представителях микроводорослей (Cooksey et al., 1987; de la Jara et al., 2003; Guzmán et al., 2010; Hallenbeck et al., 2015; Satpati, Pal, 2015). Наряду с использованием флуоресцентных красителей существует подход, основанный на применении бокового светорассеяния как показателя внутренней структуры клеток: при накоплении липидов данный параметр возрастает (Нюка et al., 2013; Satpati, Pal, 2015). Двумя основными флуоресцентными красителями для определения содержания липидов являются Nile Red (NR) и BODIPY 505/515 (Govender et al., 2012; Balduyck et al., 2015; Alemán-Nava et al., 2016). Они легко проникают в клетки микроводорослей. NR способен связываться с нейтральными и полярными липидами, давая соответственно желтую и красную флуоресценцию (Doan, Obbard, 2011; Govender et al., 2012). Красная флуоресценция перекрывается с флуоресценцией хлорофилла *a*, поэтому для водорослей оценивают только содержание нейтральных липидов (Satpati, Pal, 2015). Огромное преимущество красителя NR в том, что при окрашивании он не требует отмывки, так как его флуоресцентный выход в полярных средах очень низкий и фоновое окрашивание отсутствует (Cooksey et al., 1987). Краситель BODIPY 505/515 дает фоновую флуоресценцию (Alemán-Nava et al., 2016), но при его использовании клетки сохраняются в жизнеспособном состоянии (Govender et al., 2012). Содержание липидов коррелирует с содержанием каротиноидов, поэтому окрашивание NR можно использовать в качестве косвенного метода определения содержания каротиноидов, что показано на *D. salina* (Mendoza et al., 2008). Окрашенные NR клетки микроводорослей остаются жизнеспособными, что позволяет использовать этот краситель для сортировки липидогенных штаммов (Carrier et al., 2018). Данный метод применялся не только для решения вопросов, связанных с биотехнологией микроводорослей, но и для выполнения такой фундаментальной задачи, как выявление механизмов, определяющих формирование цветения *Heterosigma akashiwo* (Tobin et al., 2013).

Исследования мембранного потенциала. Связываясь с внутренней мембраной митохондрий, липофильные красители накапливаются в этих органеллах, позволяя определить их мембранный потенциал. При снижении мембранного потенциала свечение красителей снижается (Зурочка и др., 2014). Для микроводорослей используют красители Rhodamine 123 и DiOC₆. С их помощью получено прямое свидетельство действия меди на мембраны митохондрий *Phaeodactylum tricornutum* (см.: Cid et al., 1996). На примере *D. tertiolecta* предложена оценка дыхания фитопланктона с использованием DiOC₆, применимая и для исследования природного фитопланктона. Недостаток этого красителя в том, что он воздействует непосредственно на дыхательную цепь и при неправильно подобранной концентрации окрашивает не только митохондриальные мембраны, но и все остальные мембраны клетки (Grégori et al., 2002). Для определения мембранного потенциала клеточной мембраны также используют DiBaC₄(3), флуоресценция которого увеличивается при деполяризации мембран (Peperzak, Brussaard, 2011).

Содержание активных форм кислорода. Оценка содержания активных форм кислорода — одно из важнейших направлений исследований по влиянию факторов среды на живые организмы. В связи с процессом фотосинтеза растительные организмы выделяют больше активных форм кислорода, чем животные (Peréz-Peréz et al., 2012). Некоторые микроводоросли, например представители рафидофитовых, способны выделять их в количестве, приводящем к массовой гибели животных (Oda et al., 1997). Существует большое разнообразие красителей для определения активных форм кислорода (Gomes et al., 2005), однако в альгологических исследованиях наиболее часто применяют 2'7'-дихлородигидрофлуоресцеин ди-ацетат, дигидрородамин 123 (DHR123) и дигидроэтидин (Нюка et al., 2013). Эти вещества сами по себе не флуоресцируют, но, попав в клетку, реагируют с активными формами кислорода и образуют флуоресцирующие вещества (Зурочка и др., 2014). При использовании данных красителей необходим позитивный контроль — суспензия водорослей, в которую добавлен пероксид водорода (Нюка et al., 2013).

Настоящее состояние и перспективы проточной цитометрии

С помощью ПЦ в той или иной степени исследовано более 50 видов морских одноклеточных водорослей разных отделов, представляющих интерес как объекты биотехнологии, аквакультуры или водной токсикологии. Помимо подсчета клеток как базового показателя наиболее часто оцениваются содержание липидов и жизнеспособность клеток водорослей. Меньше внимания уделено содержанию активных форм кислорода при подборе оптимальных условий культивирования или

оценке токсичности веществ. Автофлуоресценция фотосинтетических веществ чаще всего оценивается для определения состава фитопланктонного сообщества в природных водах.

Основная сложность применения метода ПЦ в альгологии – это подбор протоколов окраски, так как большинство красителей разработано для клеток человека и млекопитающих. Количество возможных красителей для оценки физиологического состояния уменьшается в связи с тем, что часть протоколов окраски предполагает манипуляции при 37°C, но такая температура является стрессовой или губительной для морских микроводорослей. Существует сложность трактовки результатов базовых показателей – прямого и бокового светорассеяния, так как в отличие от элементов крови клетки водорослей обладают огромным разнообразием форм. Ряд одноклеточных водорослей, формирующих колонии, агрегаты и пленки, не подходит для ПЦ или требует пробоподготовки для разделения на одиночные клетки. Автофлуоресценция клеток микроводорослей также ограничивает выбор флуоресцентных красителей, не позволяя использовать красители с эмиссией от 650 нм. Для синезеленых, красных и криптофитовых водорослей, обладающих фикобилинами, применение ограничивается красителями с эмиссией от 560 нм.

Важным аспектом ПЦ является стандартизация настроек приборов, особенно при сравнении результатов исследований разных лабораторий. И если для решения прикладных и фундаментальных задач медицины работа в данном направлении активно ведется, то для альгологических исследований подобная стандартизация развивается крайне слабо. В настоящее время проточные цитометры остаются достаточно дорогим оборудованием, хотя производители разрабатывают более дешевые аналоги с сохранением необходимых параметров и свойств для проведения качественного анализа, например, BD Accuri C6 и BD Accuri C6 Plus.

При указанных сложностях ПЦ обладает рядом неоспоримых преимуществ, присущих только этому методу: быстрая оценка численности, выживаемости и физиологического состояния клеток; минимальный объем пробы для анализа; проведение исследований даже при низком содержании клеток в образце; возможность обнаружения клеток с необходимыми характеристиками для дальнейшей селекции штаммов с заданными свойствами или выделения необходимых водорослей в культуру из природных сообществ. Для улучшения метода ПЦ и его более активного внедрения в альгологическую практику в первую очередь необходимо решить проблемы стандартизации настроек и разработать больше красителей для микроводорослей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, связанных с людьми или животными.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 18-4-050 в рамках программы “Приоритетные научные исследования в интересах комплексного развития Дальневосточного отделения РАН”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит старшего научного сотрудника лаборатории клеточных технологий ННЦМБ ДВО РАН А.В. Бороду за помощь в подготовке настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Диагностика онкогематологических заболеваний с помощью проточной цитометрии / Под ред. В.Л. Эммануэля. СПб.: СпецЛит. 2017. 327 с.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расшир. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 2014. 576 с.
- Князев Н.А., Печковская С.А., Скарлато С.О. и др. Влияние температурного стресса на синтез ДНК и РНК у потенциально токсичных динофлагеллят *Prorocentrum minimum* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2018. Т. 54. № 5. С. 339–345.
- Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Оценка состояния культур морских микроводорослей из разных таксономических групп при воздействии меди с помощью проточной цитометрии // Вода: химия и экология. 2018. № 10–12. С. 43–50.
- Соломонова Е.С. Динамика физиологически активных клеток пико и нанофитопланктона в прибрежных водах Черного моря // Вестн. СПбГУ. 2016. Сер. 3. Вып. 1. С. 62–72.
- Соломонова Е.С., Акимов А.И. Оценка функционального состояния культуры *Chlorella vulgaris suboblonga* методами проточной цитометрии и переменной флуоресценции // Мор. екол. журн. 2012. Т. 11. № 4. С. 78–84.
- Соломонова Е.С., Акимов А.И. Соотношение мертвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста и освещенности // Мор. екол. журн. 2014. Т. 13. № 1. С. 73–81.
- Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. P. 128. 74–79.
- Balduyck L., Veryser C., Goiris K. et al. Optimization of a Nile Red method for rapid lipid determination in autotrophic, marine microalgae is species dependent // J. Microbiol. Methods. 2015. V. 128. P. 152–158.
- Børsheim K.Y., Harboe T., Jonsen T. et al. Flow cytometric characterization and enumeration of *Chrysochromulina polylepsis* during a bloom along the Norwegian coast // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 1989. Vol. 54. P. 307–309.
- Carrier G., Baroukh C., Rouxel C. et al. Draft genomes and phenotypic characterization of *Tisochrysis lutea* strains. Toward the production of domesticated strains with high added value // Algal Res. 2018. V. 29. P. 1–11.

- Chew K.W., Yap J.Y., Show P.L. et al. Microalgae biorefinery: High-value products perspectives // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 229. P. 53–62.
- Chioccioli M., Hankamer B., Ross I.L. Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e97269.
- Cid A., Fidargo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // *Cytometry. Part A*. 1996. V. 25. P. 32–36.
- Cid A., Torres E., Herrero C., Abalde J. Disorders provoked by copper in the marine diatom *Phaeodactylum tricornerutum* in short-time exposure assays // *Cah. Biol. Mar.* 1997. V. 38. P. 201–206.
- Cooksey K.E., Guckert G.B., Williams S.A., Callis P.R. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red // *J. Microbiol. Methods*. 1987. V. 6. P. 333–345.
- Cunningham A., Buonaccorsi G.A. Narrow-angle forward light scattering from individual algal cells: implications for size and shape discrimination in flow cytometry // *J. Plankton. Res.* 1992. V. 14. P. 223–234.
- Cunningham A., Leftley J.W. Application of flow cytometry to algal physiology and phytoplankton ecology // *FEMS Microbiol. Rev.* 1986. V. 1. P. 159–164.
- Dashkova V., Malashenkov D., Poulton N. et al. Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis // *Methods*. 2017. V. 112. P. 188–200.
- Debelius B., Forja J.M., Del Valls T.A., Lubián L.M. Toxicity of copper in natural marine picoplankton populations // *Ecotoxicology*. 2009. V. 18. P. 1095–1103.
- Doan T.-T.Y., Obbard J.P. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. // *J. Appl. Phycol.* 2011. V. 23. P. 895–901.
- Dorsey J., Yentsch C.M., Mayo S., McKenna C. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae // *Cytometry. Part A*. 1989. V. 10. P. 622–628.
- Eleršek T. The advantages of flow cytometry in comparison to fluorometric measurement in algal toxicity test // *Acta Biologica Slovenica*. 2012. V. 55. № 2. P. 3–11.
- Esperanza M., Houde M., Seoane M. et al. Does a short-term exposure to atrazine provoke cellular senescence in *Chlamydomonas reinhardtii*? // *Aquat. Toxicol.* 2017. V. 189. P. 184–193.
- Figuerola R.I., Garcés E., Bravo I. The use of flow cytometry for species identification and life-cycle studies in dinoflagellates // *Deep-Sea Res., Part II*. 2010. V. 57. P. 301–307.
- Forget N., Belzile C., Rioux P., Nozais C. Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry // *J. Bot. Educ.* 2010. V. 44. P. 185–189.
- Franklin N.M., Stauber J.L., Lim R.P. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters // *Environ. Toxicol. Chem.* 2001. V. 20. P. 160–170.
- Franqueira D., Orosa M., Torres E. et al. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae // *Sci. Total. Environ.* 2000. V. 247. P. 119–126.
- Gomes A., Ferdandes E., Lima J.L.C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2005. V. 65. P. 45–80.
- Govender T., Ramanna L., Rawat I., Bux F. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 114. P. 507–511.
- Grégori G., Denis M., Lefèvre D., Beker B. A flow cytometric approach to assess phytoplankton respiration // *Methods Cell Sci.* 2002. V. 24. P. 99–106.
- Günerken E., D'Hondt E., Eppink M. et al. Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling // *Algal Res.* 2017. V. 25. P. 25–31.
- Guzmán H.M., de la Jara Valido A., Duarte L.C., Presmanes K.F. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions // *Aquacult. Int.* 2010. V. 18. P. 189–199.
- Hallenbeck P.C., Grogger M., Mraz M., Veverka D. The use of Design of Experiments and Response Surface Methodology to optimize biomass and lipid production by the oleaginous marine green alga, *Nannochloropsis gaditana* in response to light intensity, inoculum size and CO₂ // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 184. P. 161–168.
- Hamed I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016. V. 15. P. 1104–1123.
- Hejazi M.A., Kleinegriss D., Wijffels R.H. Mechanism of extraction of β -carotene from microalga *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 88. P. 593–600.
- Hong H.-H., Lee H.-G., Jo J. et al. The exceptionally large genome of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae): determination by flow cytometry // *Algae*. 2016. V. 31. P. 373–378.
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 2–16.
- Jamers A.N., Lenjou M., Deraedt P. et al. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) // *Eur. J. Phycol.* 2009. V. 44. P. 541–550.
- de la Jara A., Mendoza H., Martel A. et al. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptocodinium cohnii* // *J. Appl. Phycol.* 2003. V. 15. P. 433–438.
- Jochem F.J. Probing the physiological state of phytoplankton at the single-cell level // *Sci. Mar.* 2000. V. 64. P. 183–195.
- Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe // *Biotech. Histochem.* 1995. V. 70. P. 220–233.
- Kleinegriss D.M., van Es M.A., Janssen M. et al. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina* // *J. Appl. Phycol.* 2010. V. 22. P. 645–649.
- Koch F., Kang Y., Villareal T.A. et al. A novel immunofluorescence flow cytometry technique detects the expansion of brown tides caused by *Aureoumbra lagunensis* to the Caribbean Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. P. 4947–4957.
- Levy J.L., Stauber J.L., Jolley D.F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity // *Sci. Total Environ.* 2007. V. 387. P. 141–154.
- Long M., Paul-Pont I., Hégaret H. et al. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation // *Environ. Pollut.* 2017. V. 228. P. 454–463.
- MacIntyre H.L., Cullen J.J. Classification of phytoplankton cells as live or dead using the vital stains fluorescein diacetate and 5-chloromethylfluorescein diacetate // *J. Phycol.* 2016. V. 52. P. 572–589.

- Marie D., Rigaut-Jalabert F., Vaulot D. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples // *Cytometry: Part A*. 2014. V. 85. P. 962–968.
- Marie D., Simon N., Guillou L. et al. DNA/RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry // *Current protocols in cytometry*. 2000. V. 11. P. 11.12.1–1.12.14. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1112s11>
- Mazálova P., Šarhanova P., Ondřej V., Pouličková A. Quantification of DNA content in freshwater microalgae using flow cytometry: a modified protocol for selected green microalgae // *Fottea*. 2011. V. 11. P. 317–328.
- Mendoza H., de la Jara A., Freijanes K. et al. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains // *Electron J. Biotechnol.* 2008. V. 11. P. 2–13.
- Oda T., Nakamura A., Shikayama M. et al. Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton // *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 1997. V. 61. P. 1658–1662.
- Peperzak L., Brussaard C.P.D. Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton // *J. Phycol.* 2011. V. 47. P. 692–702.
- Pereira H., Schulze P.S.C., Schüler L.M. et al. Fluorescence activated cell-sorting principles and applications in microalgal biotechnology // *Algal Res.* 2018. V. 30. P. 113–120.
- Pérez-Pérez M.E., Lemaire S.D., Crespo J.L. Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 156–164.
- Picot J., Guerin C.L., Kim C.L.V., Boulanger C.M. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation // *Cytotechnology*. 2012. V. 64. P. 109–130.
- Satpati G.G., Pal R. Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining – an improved technique // *Ann. Microbiol.* 2015. V. 654. P. 937–949.
- Segovia M., Berges J.A. Inhibition of caspase-like activities prevents the appearance of reactive oxygen species and dark-induced apoptosis in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* // *J. Phycol.* 2009. V. 45. P. 1116–1126.
- Seoane M., Esperanza M., Rioboo C. et al. Flow cytometric assay to assess short-term effects of personal care products on marine microalga *Tetraselmis suecica* // *Chemosphere*. 2017. V. 171. P. 339–347.
- Shapiro H.M. *Practical flow cytometry*. Fourth edition. Hoboken, New Jersey: Wiley. 2003. 681 p.
- Skarlato S., Filatova N., Knyazev N. et al. Salinity stress response of the invasive dinoflagellate *Prorocentrum minimum* // *Estuarine, Coastal-Shelf Sci.* 2018. V. 211. P. 199–207.
- Stauber J., Franklin N., Adams M. Microalgal toxicity tests using flow cytometry // *Small-scale freshwater toxicity investigations*. V. 1: Toxicity tests methods / Eds. C. Blaise, J.-F. Ferard. Netherlands: Springer. 2005. P. 203–241.
- Stauffer B.A., Schaffner R.A., Wazniak C., Caron D.A. Immunofluorescence flow cytometry technique for enumeration of the brown-tide alga, *Aureococcus anophagefferens* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 6931–6940.
- Tobin E.D., Grünbaum D., Patterson J., Cattolico R.A. Behavior and physiological changes during benthic – pelagic transition in the harmful alga, *Heterosigma akashiwo*: potential for rapid bloom formation // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. 1–15. e76663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076663>
- Trask B.J., van den Engh G.J., Elgershuizen J.H.B.W. Analysis of phytoplankton by flow cytometry // *Cytometry: Part A*. 1982. V. 2. P. 258–264.
- van den Engh G.J., Doggett J.K., Thompson A.W. et al. Dynamics of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* at station ALOHA revealed through flow cytometry and high resolution vertical sampling // *Front. Mar. Sci.* 2017. V. 4. № 359.
- Vaulot D., Olson R.J., Chrisholm S.W. Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species // *Exp. Cell Res.* 1986. V. 167. P. 38–52.
- Veldhuis M.J.W., Kraay G.W. Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives // *Sci. Mar.* 2000. V. 64. 121–134.
- Veldhuis M., Kraay G., Timmermans K. Cell death in phytoplankton: correlation between changes in membrane permeability, photosynthetic activity, pigmentation and growth // *Eur. J. Phycol.* 2001. V. 36. P. 167–177.
- Vigani M., Parisi C., Rodríguez-Cerezo E. et al. Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU // *Trends Food Sci. Technol.* 2015. V. 42. P. 81–92.
- Yentsch C.M., Mague F.C., Horan P.K., Muirhead K. Flow cytometric DNA determinations on individual cells of the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* var. *excavata* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1983. V. 67. P. 175–183.
- Zetsche E.-M., Meysman F.J.R. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton // *J. Plankton Res.* 2012. V. 34. P. 493–509.

Flow Cytometry as a Method to Study Marine Unicellular Algae: Development, Problems, and Prospects

Zh. V. Markina^{a, b}

^aZhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bFar Eastern Federal University, Vladivostok 690091, Russia

For more than past three decades, flow cytometry has been successfully applied in various, including phytoplankton, studies that require rapid qualitative assessment of physiological condition, chemical composition, and number of microalgal cells. The potential of this method for solving applied and fundamental problems in microalgal research, the parameters of main fluorescent dyes used for this method, the features of microalgae as study objects, as well as the challenges associated with the use of the method, are discussed in the present review.

Keywords: flow cytometry, unicellular algae, fluorescence, biotechnology