

УДК 582.263:57.084.1

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *TETRASELMIS* (CHLOROPHYTA): КАЛИБРОВОЧНЫЕ КРИВЫЕ И УРАВНЕНИЯ ДЛЯ ПОДСЧЕТА

© 2022 г. Ж. В. Маркина¹, *, С. И. Масленников¹, Л. А. Боцун¹

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

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 06.10.2022 г.

Получены уравнения регрессии для учета с помощью спектрофотометрического метода численности клеток четырех видов микроводорослей рода *Tetraselmis* (Chlorophyta), широко применяемых в биотехнологии. Коэффициенты корреляции между численностью и оптической плотностью составили 0.856, 0.941, 0.787 и 0.916 для *Tetraselmis viridis*, *T. striata*, *T. maculata* и *Tetraselmis* sp. соответственно, что свидетельствует о точности этого метода при его использовании для определения численности клеток.

Ключевые слова: аквакультура, микроводоросли, *Tetraselmis*, спектрофотометрический метод

DOI: 10.31857/S0134347522060109

Зеленые одноклеточные водоросли рода *Tetraselmis* культивируют в промышленных масштабах (Pereira et al., 2018; Lee et al., 2021). Их выращивают для использования в качестве корма в аквакультуре морских беспозвоночных (Sivakumar et al., 2011; Hamed, 2016; Sharawy et al., 2020) и мальков рыб (Tulli et al., 2012), а также для производства биотоплива (Sarpal et al., 2019; Lee et al., 2021) и получения каротиноидов (Sansone et al., 2017; Sarpal et al., 2019), белков (Barka, Blecker, 2016; Teuling et al., 2017) и полиненасыщенных жирных кислот (Mohammadi et al., 2015). Преимущество данных видов перед большинством других видов микроводорослей заключается в высокой экологической пластичности по температурному и соленостному режимам (Mohammadi et al., 2015).

В условиях экспериментальных и промышленных технологических циклов необходим метод быстрого подсчета численности клеток микроводорослей. Классический метод подсчета клеток под микроскопом в счетных камерах (Нажотта, Горяева, Седвика–Рафтера и др.) занимает много времени (Franklin et al., 2001; Günerken et al., 2017). Многие другие методы быстрой оценки численности микроводорослей обладают рядом недостатков. Например, при использовании метода, основанного на определении сухого веса клеток, он может заметно различаться в зависимости от количества накопленных веществ, к тому же при анализе в пробу попадают

соли из морской воды, что искажает результаты измерений (Günerken et al., 2017). Другой быстрый способ оценить рост популяции – измерение флуоресценции хлорофилла *a* с помощью флуориметров, однако эти данные плохо коррелируют с численностью клеток, что было показано на зеленых водорослях и цианобактериях при высоких концентрациях клеток (Eleršek, 2012; Bertone et al., 2019). В настоящее время самым точным и быстрым методом для решения биотехнологических задач является проточная цитометрия. Этот метод позволяет верно определить численность клеток даже при их небольшом количестве в пробе. Существенными ограничениями метода являются дороговизна самого прибора и его обслуживания, а также проблема качественной подготовки оператора (Нука et al., 2013; Маркина, 2019). Не менее активно используется метод спектрофотометрического определения оптической плотности микроводорослей с последующим пересчетом на численность клеток. В отличие от прямого подсчета клеток под микроскопом и проточной цитометрии, это косвенный метод, однако он получил широкое распространение благодаря экономичности и скорости применения. К тому же спектрофотометры занимают мало места и приемлемы для работы в полевых условиях (Chirivella-Martorell et al., 2018; Havlik et al., 2022). Ограничением этого метода является необходимость создания калибровочных кривых и уравнения регрессии для расчета численности клеток по оптиче-

Таблица 1. Коэффициенты уравнения регрессии $y = ax + b$ и коэффициент корреляции R^2 для микроводорослей рода *Tetraselmis*

Вид	<i>a</i>	<i>b</i>	R^2
<i>Tetraselmis viridis</i>	0.002	0.053	0.856
<i>Tetraselmis striata</i>	0.004	0.042	0.941
<i>Tetraselmis maculata</i>	0.002	0.091	0.787
<i>Tetraselmis</i> sp.	0.003	0.023	0.916

ской плотности для каждого подсчитываемого вида микроводорослей.

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключалась в построении калибровочных кривых, а также в получении уравнения регрессии на основе оценки данных по численности клеток и оптической плотности культур одноклеточных водорослей *Tetraselmis viridis*, *T. maculata*, *T. striata* и *Tetraselmis* sp.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили культуры одноклеточных водорослей *Tetraselmis viridis* MBRU_PV85, *T. maculata* MBRU_TM93, *T. striata* MBRU_P86 и *Tetraselmis* sp. (Chlorophyta). Водоросли выращивали на среде *f* (Guillard, Ryther, 1962), приготовленной на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰ в 250-миллиметровых колбах Эрленмейера с объемом культуральной среды 200 мл, при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, интенсивности освещения 2500 лк в области видимого света и свето-темновым периодом 12 ч свет : 12 ч темнота. В качестве инокулята использовали культуры на экспоненциальной стадии роста.

Таблица 2. Сравнение данных по численности и оптической плотности микроводоросли *Tetraselmis viridis*, определенных в кювете и 96-луночном планшете

Данные цитометра по численности, кл/мл	Оптическая плотность	
	в кювете	в планшете
464330	0.079	0.097
613487	0.137	0.092
500067	0.099	0.093
777200	0.119	0.095
381227	0.062	0.052
356153	0.061	0.054
310557	0.049	0.036
331140	0.057	0.052
169007	0.032	0.027
261057	0.035	0.035
441363	0.088	0.077
480253	0.081	0.076
498760	0.105	0.098
465923	0.091	0.089

Продолжительность экспериментов составляла 28 сут. Пробы для подсчета клеток и определения оптической плотности отбирали на 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25 и 28-е сут опыта.

Численность клеток подсчитывали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа в течение каждого измерения записали 20 000 событий (регистрируемых в пробе частиц). Выбор клеток водорослей из общего числа событий, регистрируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла *a*. Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм (Нука et al., 2013), для проточного цитометра CytoFLEX канал регистрации данных – PC 5.5. Погрешность измерений 5%.

Оптическую плотность на длине волны 750 нм (OD_{750}) определяли с помощью спектрофотометра ПЭ-5400ВИ (Экрос, Россия) в стеклянных кюветах с оптическим путем 10 мм для всех исследованных видов. Оптическую плотность *T. viridis* определяли также с помощью мультимодального планшетного ридера Spark 10 TM (Tecan, Швейцария) в стеклянной кювете с оптическим путем 10 мм и в 96-луночном пластиковом планшете. Погрешность измерений для оптической плотности составляла 0.5%. Известно, что длина волны 750 нм применялась для определения оптической плотности разных представителей одноклеточных водорослей (Detweiler et al., 2015; Hirooka et al., 2020; Hotos et al., 2020; Gao et al., 2021; Plöhn et al., 2021; Yoshitomi et al., 2021). Данная длина волны позволяет избежать поглощения света фотосинтетическими пигментами, которые могут влиять на этот показатель, и дает возможность измерить оптическую плотность самих клеток (Griffiths et al., 2011; Chioccioli et al., 2014; Hotos et al., 2020).

Эксперименты проведены в трех биологических повторностях. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность клеток определяли на разных фазах роста культур: лаг-фазе, экспоненциальной и стационарной. Максимальная концентрация клеток составляли 3949×10^3 кл/мл для *T. viridis*, 2539×10^3 кл/мл для *T. striata*, 4038×10^3 кл/мл для *T. maculata* и 4038×10^3 кл/мл для *Tetraselmis* sp. Графики для построения уравнения регрессии $y = ax + b$ представлены в уравнении $y = ax + b$, где y – численность клеток $\times 10^3$ /мл; a и b – коэффициенты, указанные в табл. 1; x – оптическая плотность, измеренная на длине волны 750 нм. Полученные для разных видов коэффициенты корреляции варьировали от 0.787 до 0.941 (табл. 1).

Сравнение данных оптической плотности культуры *T. viridis*, полученных в стеклянной кювете и 96-луночном пластиковом планшете, пока-

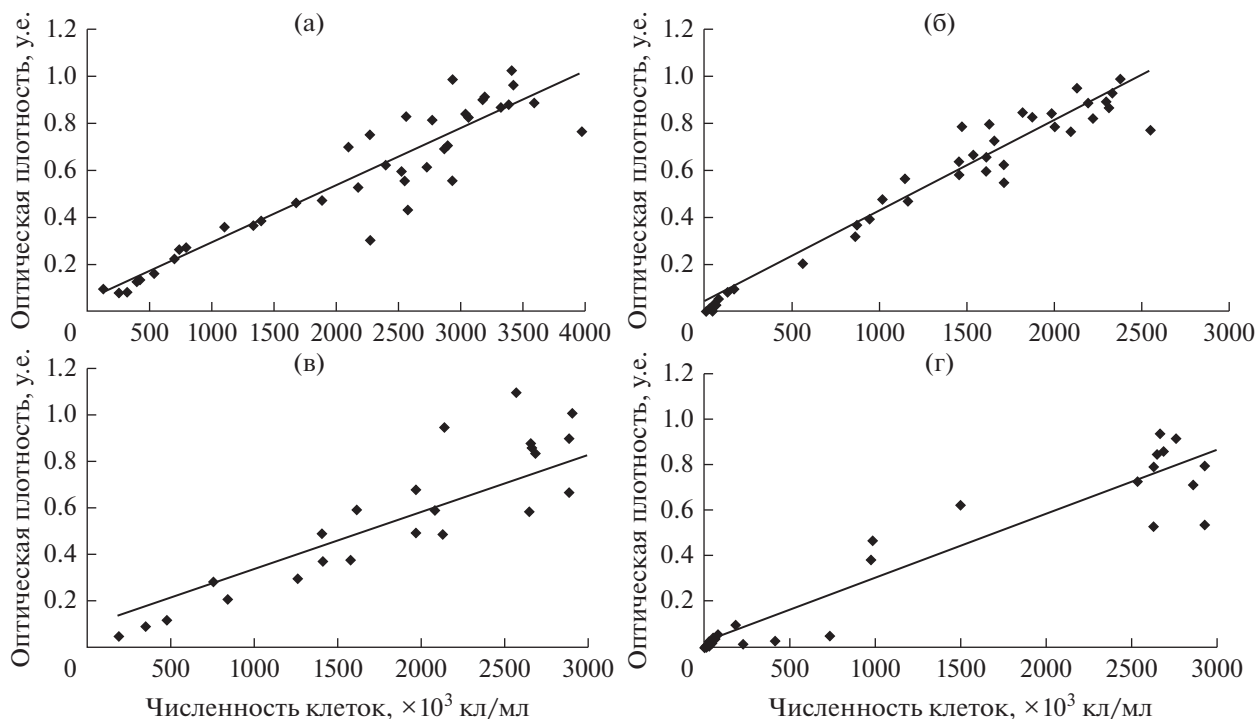


Рис. 1. Связь оптической плотности и численности клеток микроводорослей рода *Tetraselmis*: а – *Tetraselmis viridis*, б – *Tetraselmis striata*, в – *Tetraselmis maculata*, г – *Tetraselmis* sp.

зало, что значения оптической плотности, полученные разными способами, совпадали практически во всех случаях (табл. 2). Поэтому для сокращения трудозатрат можно использовать 96-луночный пластиковый планшет.

Таким образом, нами получены калибровочные зависимости, позволяющие с помощью спектрофотометра быстро, просто и точно определять численность клеток четырех видов микроводорослей рода *Tetraselmis*, имеющих большое значение в аквакультуре. Высокие коэффициенты корреляции подтверждают точность данного метода.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Нине Александровне Айздайчер за поддержание культур, использованных в работе. Культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis* MBRU_PV85, *T. striata* MBRU_P86 и *T. maculata* MBRU_TM93, а также возможность работы на мультимодальном планшетном ридере Spark 10 TM предоставлены ресурсным центром “Морской биобанк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Маркина Ж.В. Проточная цитометрия как метод исследования морских одноклеточных водорослей: развитие, проблемы, перспективы // Биол. моря. 2019. Т. 45. № 5. С. 291–298.
- Barka A., Blecker C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2016. V. 20. № 30. P. 427–436.
- Bertone E., Chuang A., Burford M.A., Hamilton D.P. In-situ fluorescence monitoring of cyanobacteria: Laboratory-based quantification of species-specific measurement accuracy // Harmful Algae. 2019. V. 87. Art. 101625.
- Chioccioli M., Hankamer B., Ross J.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. Art. e97269.
- Chirivella-Martorell J., Briz-Redón Á., Serrano-Aroca Á. Modelling of biomass concentration, multi-wavelength absorption and discrimination method for seven important marine microalgae species // Energies. 2018. V. 11. № 5. 1089.

- Detweiler A.M., Mioni C.E., Hellier K.L. Evaluation of wavelength selective photovoltaic panels on microalgae growth and photosynthetic efficiency // *Algal Res.* 2015. V. 9. P. 170–177.
- Eleršek T. The advantages of flow cytometry in comparison to fluorometric measurement in algal toxicity test // *Acta Biol. Slov.* 2012. V. 55. № 2. P. 3–11.
- 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.
- Gao F., Sá M., Teles I. et al. Production and monitoring of biomass and fucoxanthin with brown microalgae under outdoor conditions // *Biotechnol. Bioeng.* 2021. V. 118. № 3. P. 1355–1365.
- Griffiths M.J., Garcin C., van Hille R.P., Harrison S.T. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density // *J. Microbiol. Methods.* 2011. V. 85. № 2. P. 119–123.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. // *Can. J. Microbiol.* 1962. V. 8. P. 229–239.
- Günerken E., Hondt E.D., 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.
- Hamed I. The evolution and versatility of microalgal biotechnology: a review // *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016. V. 15. P. 1104–1123.
- Havlik I., Beutel S., Scheper T., Reardon K.F. On-line monitoring of biological parameters in microalgal bioprocesses using optical methods // *Energies.* 2022. V. 15. № 3. P. 875.
- Hirooka S., Tomita R., Fujiwara T. et al. Efficient open cultivation of cyanidiales red algae in acidified seawater // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 1–12.
- Hotos G.N., Avramidou D., Bekiari V. Calibration curves of culture density assessed by spectrophotometer for three microalgae (*Nephroselmis* sp., *Amphidinium carterae* and *Phormidium* sp.) // *Eur. J. Biol. Biotechnol.* 2020. V. 1. № 6. P. 1–7.
- Hyka P., Liskova S., Přebyl P. et al. Flow cytometry for development of biotechnological processes with microalgae // *Biotechnol. Adv.* 2013. V. 31. P. 2–16.
- Lee W.-K., Ryu Y.-K., Choi W.-Y. et al. Year-round cultivation of *Tetraselmis* sp. for essential lipid production in a semi-open raceway system // *Mar. Drugs.* 2021. V. 19. № 6. P. 314.
<https://doi.org/10.3390/md19060314>
- Mohammadi M., Kazeroni N., Baboli M.J. Fatty acid composition of the marine micro alga *Tetraselmis chuii* Butcher in response to culture conditions // *J. Algal Biomass Utiln.* 2015. V. 6. P. 49–55.
- Pereira H., Páramo J., Silva J. et al. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: From an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1–11.
- Plöhn M., Escudero-Onate C., Funk C. Biosorption of Cd (II) by nordic microalgae: tolerance, kinetics and equilibrium studies // *Algal Res.* 2021. V. 59. 102471.
- Sansone C., Galasso C., Orefice I. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–12.
- Sarpal A.S., Teixeira C.M.L.L., Costa C.R.I. et al. Evaluation of low cost medium for the production of lipids for biodiesel and carotenoids from microalgae *Tetraselmis aff chuii* // *World J. Aquat. Res. Dev.* 2019. V. 1. № 1. P. 27–35.
- Sivakumar N., Sundararaman M., Selvakumar G. Efficacy of micro algae and cyanobacteria as a live feed for juveniles of shrimp *Penaeus monodon* // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. V. 10. P. 11594–11599.
- Sharawy Z.Z., Ashour M., Abbas E. et al. Effects of dietary marine microalgae, *Tetraselmis suecica*, on production, gene expression, protein markers and bacterial count of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* // *Aquacult. Res.* 2020. V. 51. № 6. P. 2216–2228.
- Teuling E., Wierenga P.A., Schrama J.W., Gruppen H. Comparison of protein extracts from various unicellular green sources // *J. Agric. Food Chem.* 2017. V. 65. P. 7989–8002.
- Tulli F., Chini Zittelli G., Giorgi G. et al. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets // *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 2012. V. 21. P. 188–197.
- Yoshitomi T., Karita H., Mori-Moriyama N. et al. Reduced cytotoxicity of polyethyleneimine by covalent modification of antioxidant and its application to microalgal transformation // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2021. V. 22. № 1. P. 864–874.

Application of the Spectrophotometric Method for Determination of the Cell Numbers of Microalgae in the Genus *Tetraselmis* (Chlorophyta): Calibration Curves and Equations for Calculation

Zh. V. Markina^a, S. I. Maslennikov^a, and L. A. Botsun^a

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

The spectrophotometric method is used to count the number of microalgal cells. Regression equations were obtained for four species of the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta), that are widely used in biotechnology. The correlation coefficients between cell number and optical density were 0.856, 0.941, 0.787, and 0.916 for *Tetraselmis viridis*, *T. striata*, *T. maculata*, and *Tetraselmis* sp. respectively, which demonstrates the precision of this method for cell counting.

Keywords: aquaculture, microalgae, *Tetraselmis*, spectrophotometric method