

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2019 г. Е. О. Пучков*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино, 142290, Россия

**e-mail: puchkov@ibpm.pushchino.ru*

Поступила в редакцию 15.06.2018 г.

После доработки 27.09.2018 г.

Принята к публикации 27.09.2018 г.

Современные представления о жизни микроорганизмов сложились в значительной мере благодаря исследованиям на популяционном уровне. Такой подход был связан с необходимостью преодоления ограничений по чувствительности используемых физико-химических, молекулярно-биологических и генетических методов. При этом потенциальные различия отдельных клеток нивелировались, свойства всех клеток усреднялись, а полученные сведения характеризовали исследуемые микробные популяции в целом. Со временем некоторые аналитические методы были усовершенствованы настолько, что открылась перспектива количественно исследовать многие физико-химические и морфологические свойства отдельных микробных клеток. Это позволило по-новому подойти к решению ряда проблем, к числу которых относятся гетерогенность микробных популяций, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. В настоящем обзоре кратко рассмотрены основные методы количественного анализа единичных клеток бактерий и дрожжей на клеточном и субклеточном уровне, а также примеры их применения по сведениям литературы за последние пятнадцать лет.

Ключевые слова: бактерии, дрожжи, морфометрия, биопленки, жизнеспособность, гетерогенность, флуоресцентная микроскопия, фазовоконтрастная микроскопия, микроскопия сверхвысокого разрешения, компьютерный анализ изображений, микрофлуориметрия, флуоресцентные белки, сканирующая зондовая микроскопия, сканирующая электрохимическая микроскопия, сканирующая атомно-силовая микроскопия, микроскопия химических сил, спектроскопия сил единичных клеток, спектроскопия сил единичных молекул, проточная цитометрия, сканирующая цитометрия, нано масс-спектрометрия вторичных ионов, микро-рамановская спектроскопия

DOI: 10.1134/S0026365619010130

Метод держит в руках судьбу исследования.

И.П. Павлов

Живая клетка является основной биологической единицей мира микроорганизмов. Все микроскопические проявления этого мира являются результатом активности отдельных клеток в составе больших популяций, включая взаимодействие между членами сообщества. Размеры микроорганизмов так малы, что изучение природы жизнедеятельности каждой отдельной клетки на молекулярном уровне с помощью физико-химических методов до недавнего времени было невозможно. Основные современные представления о структурно-функциональной организации микробных клеток сформировались главным образом благодаря анализам различных препаратов, содержащих много клеток, с учетом чувствительности традиционных аналитических методов. При таком подходе полученные результаты отра-

жают усредненные свойства всех клеток в популяции. Однако существует ряд проблем, решение которых возможно только путем анализа индивидуальных клеток микроорганизмов. К их числу относятся гетерогенность микробных популяций по генотипическим и фенотипическим признакам, природа некультивируемых в лабораторных условиях и персистентных форм, развитие биопленок, взаимодействие микроорганизмов с клетками растений и животных, связь структуры и функции в метаболизме и ряд других. За последние тридцать лет некоторые аналитические методы были усовершенствованы настолько, что открылась перспектива количественно оценить многие физико-химические и морфологические свойства отдельных микробных клеток. Это позволило подойти к вышеуказанным проблемам на клеточном и субклеточном уровне.

За время, прошедшее после публикации обзоров по этой теме (Shapiro, 2000; Brehm-Stecher, Johnson, 2004), появились модификации ряда подходов, расширилось их применение, были разработаны новые методы. В связи с этим цель настоящего обзора – кратко охарактеризовать основные методы количественного анализа единичных клеток бактерий и дрожжей на клеточном и субклеточном уровне и рассмотреть примеры их применения по материалам работ, выполненных, преимущественно, после 2004 года. Тем не менее, количество публикаций по данной теме даже за этот период настолько велико, что рассмотрение и цитирование их всех не может уложиться в рамки одной статьи. Однако по отдельным вопросам рассматриваемой темы опубликованы специальные обзоры. Они по возможности максимально будут процитированы в соответствующих разделах.

ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ

Традиционные методы оптической микроскопии являются в основном качественными и субъективными. Во второй половине XX века оптическая микроскопия, благодаря применению лазеров, высокочувствительных детекторов света, цифровой фотографии и компьютерной технике трансформировалась в методологию, обеспечивающую объективные количественные исследования пространственно-временных и физико-химических характеристик объектов в масштабах единичных клеток. Особую роль в формировании этой методологии сыграли компьютерные методы обработки и анализа цифровых изображений. Они позволили не только упростить, ускорить и автоматизировать многие уже имеющиеся количественные методы, но и обеспечили получение ранее недоступной количественной информации. Это спектральные свойства и их пространственное распределение; размер и форма индивидуальных компонентов сложной геометрии, их взаимное расположение; интенсивность и спектральные свойства свечения (например, флуоресценции); динамика процессов в широком интервале времен (Puchkov, 2016a). Проиллюстрируем широкий спектр возможностей этой методологии.

Так, например, на основе компьютерного анализа изображений разработан программный комплекс для характеристики морфотипов бактерий в микробных сообществах по данным фазово-контрастной микроскопии SMEIAS (Center for Microbial Ecology Image Analysis System) (Liu et al., 2001). Этот комплекс позволяет классифицировать клетки по одиннадцати доминирующим морфотипам бактерий. С помощью SMEIAS исследована динамика микробных популяций в анаэробном биореакторе (Liu et al., 2001) и в природных биопленках (Dazzo, Niccum, 2015; Dazzo et al., 2017). Его также успешно применяли для

изучения межклеточной сигнализации в микробных популяциях (Dazzo, 2012) (о межклеточной сигнализации у микроорганизмов см. обзор Пучков, 2016).

Морфометрия с помощью компьютерного анализа данных микроскопии была использована для оценки времени первого деления единичных клеток бактерий *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa*, растущих на плотной среде (Niven et al., 2006). Разработанный подход был автоматизирован, что позволило проводить исследования на популяционном уровне и изучать распределение клеток по длительности лаг-фазы.

Интересные методические возможности открывает оригинальное микропроточное устройство, которое позволяет с помощью микроскопии, сопряженной с компьютерным анализом изображений, исследовать динамику деления отдельных клеток *E. coli* и связь этого процесса с их размерами. С помощью этого устройства был проведен анализ скоростей деления и размеров клеток нескольких сотен поколений, происходящих от одной “материнской” клетки. Было показано, что средняя скорость деления клеток сохраняется на протяжении сотен поколений. Вместе с тем существует “флуктуационная” разница в продолжительности клеточного цикла каждой пары “материнской” и “дочерней” клеток. На основании полученных данных предполагается, что каждая клетка бактерий *E. coli* имеет устойчивый механизм развития (размножения), и утрата жизнеспособности является не результатом “стохастического” старения, а накопления повреждений (Wang et al., 2010a). С использованием такого же устройства, а также мутантного по RecA белку штамма *E. coli* исследована природа пороговой зависимости увеличения средней длины клеток от скорости роста. Установлено, что при увеличении скорости роста выше определенной величины средняя длина клеток возрастает в результате стохастического подавления деления у части популяции, что, по крайней мере, частично может быть связано ограничением поступления RecA в нуклеоид (Gangan, Athale, 2017).

Особой проблемой является “извлечение” морфометрических характеристик индивидуальных бактериальных клеток из больших массивов данных микроскопии, полученных при видеорегистрации развития бактериальных популяций. Для решения этой задачи разработан программный комплекс BaSCA (Bacterial image analysis driven Single Cell Analytics) (Balomenos et al., 2017). По мнению авторов, комплекс может быть использован для решения задач системной биологии на уровне бактериальных популяций.

Два алгоритма компьютерного анализа микроскопических изображений были созданы для морфометрических исследований единичных клеток почкующихся дрожжей. Первый был ис-

пользован в роботизированном методе автоматической дифференциации морфотипов штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с делетированными генами (Liu et al., 2011). Было показано, что метод позволяет статистически достоверно различать исследуемые штаммы по морфологическим признакам, в том числе на разных фазах роста. Второй алгоритм был разработан для выявления фазы клеточного цикла путем автоматического “извлечения” из микроскопического изображения геометрических характеристик клеток в целом и почки в частности (Yu et al., 2011).

Благодаря использованию компьютерного анализа изображений произошло значительное усовершенствование флуоресцентной микроскопии. Практически весь обширный набор исследовательских “инструментов”, основанных на явлении флуоресценции (Lakowicz, 2006), теперь стал применим на уровне единичных клеток.

Так, прежде всего, оказалось возможным сделать более объективными и менее трудоемкими некоторые традиционные количественные методы с использованием окраски микроорганизмов флуоресцентными красителями. Один из примеров – компьютерная программа автоматического учета числа активно дышащих бактерий по данным флуоресцентной микроскопии в образцах речной воды (Ogawa et al., 2003). Та же программа в усовершенствованном виде была использована для выявления, идентификации и оценки дыхательной активности бактерий *E. coli* O157:H7 в молоке (Ogawa et al., 2005). Другой пример – автоматический учет доли поврежденных клеток *S. cerevisiae* после двойного витального окрашивания с применением программы ImageJ (National Institutes of Health, США; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). В сухих препаратах дрожжей этот показатель коррелировал с жизнеспособностью клеток (Puchkov, 2014). Аналогичный подход с использованием программы ImageJ был разработан для оценки жизнеспособности цианобактерий (Schulze et al., 2011).

Ведутся работы по внедрению информационной технологии глубинного анализа данных (data mining) (Han et al., 2011) для изучения взаимосвязи морфологических признаков окрашенных флуоресцентными красителями клеток дрожжей *S. cerevisiae* с их функциональными свойствами (Ohtani et al., 2004). С этой целью сформирована база морфологических данных *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* Morphological Database, SCMD) (Saito et al., 2004) и создана специальная программа для фенотипирования мутантов дрожжей (Ohya et al., 2005). Глубинный анализ данных позволил, в частности, установить, что делеция почти половины генов у *S. cerevisiae*, не существенных для роста, влияет на некоторые морфологические признаки. Изучается возможность использова-

ния данного подхода при поиске антифунгальных агентов (Gebre et al., 2015), а также для работы с дрожжами *Schizosaccharomyces* (Negishi et al., 2009).

Компьютерный анализ изображений позволяет измерять параметры флуоресценции на субклеточном уровне. Для сравнительно крупных объектов, таких как дрожжи, это можно осуществлять с помощью стандартной эпифлуоресцентной микроскопии широкого поля (Puchkov, 2016) или конфокальной микроскопии (Day et al., 2016). Так, с помощью субклеточной микрофлуориметрии была определена вязкость внутри вакуолей *S. cerevisiae* (подробнее о внутриклеточной вязкости см. обзор Пучков, 2014) и разработан подход, получивший название “псевдоспектральный анализ”, для изучения на примере доксорубина и клеток *S. cerevisiae* в качестве модели внутриклеточной локализации противораковых препаратов в клетках животных и человека (Puchkov, 2016).

Применение технологии мечения флуоресцирующими белками (ФБ), которые являются производными и аналогами зеленого флуоресцирующего белка (Tsien, 1998), привело к значительному прогрессу в изучении внутриклеточной структуры и функций живых клеток, включая микробные (Snapp, 2005).

В исследованиях, связанных с локализацией определенных белков, меченных ФБ, у разных штаммов или у одних и тех же штаммов дрожжей при разных условиях культивирования необходима автоматизация количественного сравнения больших массивов данных. С этой целью разработана специальная программа компьютерного анализа изображений (Chen et al., 2007). В качестве одного из перспективных подходов сопряжения протеомного анализа с локализацией белков в клетках создана коллекция дрожжей с белками, меченными ФБ (Chong et al., 2012). Для изучения гетерогенности бактериальных популяций по проявлению признаков у генетически сконструированных штаммов в рамках программ по синтетической биологии разработан протокол MUSIQ (Microscope fLUorescence SIngle cell Quantification), также основанный на технологии мечения ФБ и компьютерного анализа изображений (Cortesi et al., 2017).

Особый интерес представляет изучение динамики распределения белков в интактных (не фиксированных) препаратах дрожжей. Например, исследована локализация и перемещение трех меченных ФБ белков Lac репрессора (LacR), встроенного в кластер генов белка Chrl1, белка Cut11 ядерной мембраны и компонента Sid4 веретена в делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* (Bjering et al., 2012). Методические аспекты изучения единичных интактных делящихся дрожжей с ис-

пользованием ФБ и флуоресцентной микроскопии обобщены в обзоре (Mulvihill, 2017).

Сравнительно недавно были разработаны методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (“наноскопии”), которые позволяют исследовать внутриклеточные структуры с размерами порядка 0.02–0.04 мкм и даже отслеживать локализацию и движение отдельных макромолекул. В основе этих методов лежит использование химерных белков, меченных ФБ (Yao, Carballido-López, 2014). Развиваются и альтернативные методы введения флуоресцентных меток во внутриклеточные белки для “наноскопии” (Minoshima, Kikuchi, 2017).

Существует два основных подхода микроскопии сверхвысокого разрешения (Gahlmann, Moerner, 2014). Первый позволяет следить за перемещениями флуоресцирующей молекулы белка, который экспрессирован или активирован в очень низкой концентрации – одна или две молекулы на клетку. Во втором регистрируют серию изображений флуоресценции молекул одного и того же белка, меченных разными флуорофорами, свечение которых может “включаться” или “выключаться” специальными световыми импульсами. Компьютерная обработка изображений, наложенных друг на друга, позволяет выявить положение в клетке расположенных рядом флуоресцирующих белков, расстояние между которыми 0.02–0.04 мкм.

С помощью этой методологии получено много фундаментальных сведений о цитоскелете бактерий и организации нуклеоида (Yao, Carballido-López, 2014), о динамике транскрипции (Stracy, Karanidis, 2017) и трансляции (Gahlmann, Moerner, 2014), о динамике белков, взаимодействующих с ДНК (Uphoff, 2016), об организации секреторных систем и внутриклеточной компарментализации (Schneider, Basler, 2016). Имеются примеры использования микроскопии сверхвысокого разрешения для изучения механизмов действия противобактериальных препаратов (Choi et al., 2016).

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

Существует четыре основных вида сканирующей зондовой микроскопии: сканирующая туннельная микроскопия (СТМ), сканирующая электрохимическая микроскопия (СЭХМ), сканирующая магнитно-силовая микроскопия (СМСМ) и сканирующая атомно-силовая микроскопия (САСМ). Все они основаны на регистрации взаимодействия миниатюрного механического зонда (кантелевера) с поверхностью исследуемого объекта при ее сканировании. Причем размеры зонда настолько малы, что позволяют характеризовать физическо-химические свойства поверхности (получать “физико-химические изображе-

ния”) с разрешением вплоть до размеров атомов. СТМ основана на измерении так называемого туннельного тока, возникающего между поверхностью образца и зондом. При СЭХМ осуществляется регистрация электрохимических процессов между зондом и изучаемой поверхностью. Взаимодействие атомов зонда и исследуемого образца за счет магнитных полей или сил Ван-дер-Ваальса лежит в основе СМСМ и САСМ соответственно (Bhushan, Marti, 2011).

Сведений о применении СТМ и СМСМ для изучения единичных клеток микроорганизмов в литературе не обнаружено. Есть данные об использовании СЭХМ для изучения биохимических процессов на поверхности биопленок ряда бактерий (подробнее о принципах и методических возможностях СЭХМ при изучении биопленок см. обзор Zoski, 2016). Так, в частности, с помощью СЭХМ проводились измерения содержания перекиси водорода на поверхности биопленок *Vibrio fischeri* (Abucayon et al., 2014) и *Streptococcus gordonii* в комбинации с *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Liua et al., 2011). В первом случае показано, что каталазная активность двух штаммов *V. fischeri*, свободноживущего и живущего в симбиозе с клетками кальмара, примерно одинакова. Во втором случае благодаря анализу “химического изображения” содержания перекиси водорода на поверхности биопленки удалось установить, что на поверхности клеток *S. gordonii* генерируется перекись водорода, которая разлагается каталазой *A. actinomycetemcomitans*.

При исследовании межклеточной сигнализации в биопленках *P. aeruginosa* с помощью СЭХМ было охарактеризовано распределение редокс-активных сигнальных молекул пиоцианина в 3D пространстве над поверхностью биопленки *P. aeruginosa*. При этом была показана возможность получать “химическое изображение” редокс-активности исследуемой биопленки в 2D пространстве (Koley et al., 2011). Еще в одном исследовании, связанном с межклеточной сигнализацией, с использованием СЭХМ пиоцианина изучали реакции quorum sensing (QS) в 3D пространстве внутри и между искусственно созданными агрегатами клеток *P. aeruginosa*. Благодаря этому подходу была выявлена зависимость реакций QS от размеров агрегатов (Connella et al., 2014).

Использование АСМ в изучении микроорганизмов началось сравнительно давно, и эта область исследований обобщена в многочисленных обзорах. Поэтому имеющиеся сведения мы суммируем главным образом со ссылками на основные из них.

Первоначально АСМ использовали для получения изображений структуры поверхности нативных микробных клеток с разрешением, сопоставимым со сканирующей электронной микроскопией

(СЭМ). Осуществлялось это в водной среде, что выгодно отличало АСМ от СЭМ, которая проводится на сухих или замороженных препаратах в вакууме (Dorobantu et al., 2012). Показано применение АСМ для получения изображений структуры полисахаридов, пептидогликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и многих других компонентов поверхностей различных микробных клеток в физиологических условиях (Dufrêne, 2014).

Разрешающая способность АСМ позволяет изучать структурную организацию единичных белковых молекул в надмолекулярных комплексах. Одним из примеров реализации этой уникальной возможности АСМ является характеристика пространственной самоорганизации молекул белков оболочки бактериальных микрокомпарментов *Haliangium ochraceum* (Sutter et al., 2016) (о микрокомпарментах бактерий см. обзор Vobik et al., 2015). АСМ высокого разрешения может быть использована и для регистрации динамики формирования надмолекулярных комплексов белков. Так, с помощью специальной методики скоростной АСМ изучены структурные особенности сборки и активации MotPS статорного компонента Na⁺-типа жгутикового мотора *Bacillus subtilis* (Terahara et al., 2017).

АСМ позволяет проводить количественный анализ сил взаимодействия различных молекулярных структур, находящихся на поверхности микробных клеток, между собой и с окружающей средой. Для этого проводится модификация (функционализация) кантелевера различными химическими группировками (например, аминогруппой или карбоксильной группой), небольшими шариками (например, стеклянными или латексными) или даже целыми клетками бактерий (Lower, 2011). Поэтому на сегодняшний день можно говорить о АСМ не как о методе, а о совокупности методов: микроскопии химических сил (МХС), спектроскопии сил единичных клеток (ССЕК) и спектроскопии сил единичных молекул (ССЕМ). Они позволяют характеризовать пространственную организацию химических групп и зарядов на поверхности микробных клеток (получать “химическое изображение”), а также и измерять силы взаимодействия микроорганизмов между собой, с различными лигандами и абиогенными поверхностями (Dorobantu et al., 2012; Ott et al., 2017).

Основанные на АСМ подходы оказались наиболее востребованными при изучении микробных биопленок (Angeloni et al., 2016). Например, одна из методик АСМ позволяет исследовать деление единичных клеток бактерий *E. coli* при росте на плоской поверхности (Van Der Hofstadt et al., 2015). Получение многопараметрических АСМ изображений с использованием ССЕМ и ССЕК успешно применяли для изучения молекулярных механизмов адгезии клеток бактерий при формировании

биопленок на минеральных микрочастицах почвы (Huang et al., 2015), инструментах медицинского назначения (Herman-Bausier et al., 2017) и биотехнологическом оборудовании (James et al., 2017).

ЦИТОМЕТРИЯ

Цитометрия объединяет три основных подхода для анализа единичных клеток: проточную цитометрию (ПЦ), проточную цитометрию с визуализацией (ПЦВ (imaging flow cytometry) и сканирующую цитометрию (СЦ).

ПЦ основана на измерении оптических параметров отдельных клеток в потоке жидкости. Для этого суспензию клеток пропускают через узкий капилляр таким образом, что в потоке его центральной части единичные клетки движутся одна за другой. Поток единичных клеток проходит через оптический участок, где освещается сфокусированным пучком света. При этом в зависимости от поставленной задачи регистрируется возникающее на клетках светорассеяние под разными углами и флуоресценция, если клетки предварительно были обработаны определенными флуорохромами. ПЦ используется в микробиологии сравнительно давно и является едва ли не самым популярным методом анализа отдельных клеток в микробных популяциях. Этому способствует наличие коммерчески доступных приборов, возможность быстро анализировать большие популяции, а также широкий спектр флуорохромов, позволяющих характеризовать различные свойства клеток. Типичные коммерчески доступные приборы позволяют анализировать микробные суспензии со скоростью до 1000 клеток в секунду по 5–10 оптическим параметрам, а специализированные – до 50000 клеток в секунду и до 20 параметров одновременно. Мы не будем останавливаться на подробностях использования ПЦ в микробиологии, поскольку они достаточно полно освещены в ряде исчерпывающих обзоров, посвященных, в частности, количественному анализу гетерогенности микробных популяций (Avery, 2006; Wilkinson, 2015), оценке жизнеспособности микроорганизмов (Juzwa et al., 2016; Emerson et al., 2017), характеристике различных физиологических реакций у бактерий (Ambriz-Aviña et al., 2014), а также исследованию экологии микроорганизмов (Czechowska et al., 2008; Wang et al., 2010; Emerson et al., 2017).

На основе ПЦ разработан препаративный метод избирательного выделения клеток с определенными свойствами, основанный на измерении их флуоресценции, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Этот подход широко применяется в исследовании клеток человека и животных (Herzenberg et al., 2002). Есть примеры использования FACS в микробиологии (подробнее о других препаративных методах получения единичных кле-

ток микроорганизмов см. обзор Ishii et al., 2010). Так, например, с помощью FACS отсортировали клетки бактерий с низким содержанием нуклеиновых кислот из трех пресноводных источников. Были получены три культуры ранее неизвестных бактерий, принадлежащих к группе грамотрицательных бактерий рода *Polynucleobacter* по результатам анализа генов 16S РНК (Wang et al., 2009). Другой пример – метод, позволяющий проводить выделение бактерий из природных образцов с использованием одновременно технологии флуоресцентной гибридизации *in situ*, FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) и FACS. На примере смеси бактерий *E. coli* с ДНК фага λ показана применимость этого метода для выделения целевых бактерий в условиях загрязнения посторонним генетическим материалом (Chen et al., 2011).

ПЦВ сочетает в себе возможности ПЦ и флуоресцентной микроскопии с одновременным измерением интегральных оптических параметров клеток в потоке и получением их цифровых флуоресцентных изображений. Это дает возможность характеризовать каждую клетку в целом по ее светорассеянию и флуоресценции, а также анализировать ее морфологию и/или пространственное распределение тех или иных оптических показателей в структуре клеток (Barteneva et al., 2012). Важно, что метод позволяет быстро количественно анализировать большие популяции клеток по множеству параметров, благодаря специальным алгоритмам компьютерного анализа (Hennig et al., 2017). Первоначально, как и ПЦ, этот подход был разработан для исследования единичных клеток человека и животных (Barteneva et al., 2012), которые существенно больше по размерам, чем клетки микроорганизмов. Это связано с небольшим разрешением получаемых изображений по сравнению с обычной микроскопией. С появлением коммерчески доступных приборов метод нашел широкое применение в биомедицинских исследованиях, в том числе при изучении взаимодействия микроорганизмов с клетками макроорганизма. Так, в частности, с помощью ПЦВ разработаны подходы для изучения фагоцитоза и интернализации бактерий *Salmonella enterica* в макрофаги клеточной линии RAW 264.7 (Phanse et al., 2012), *Yersinia enterocolitica* в мононуклеарные фагоциты (Drechsler-Hake et al., 2016), *Neisseria gonorrhoeae* в нейтрофилы (Smirnov et al., 2017), *Toxoplasma gondii* и *Mycobacterium tuberculosis* в различные клеточные линии (Haridas et al., 2017). С использованием ПЦВ выявлены морфологические изменения дрожжевой формы криптококков, связанные с приобретением факторов патогенности, в мононуклеарных лимфоцитах (Okagaki et al., 2010), проведена идентификация, классификация и изучены стадии развития простейших *Plasmodium falciparum* в крови (Dekel et al., 2017). Показано применение ПЦВ

для количественной характеристики распределения клеток по стадиям клеточного цикла в популяции *S. cerevisiae* (Calvert et al., 2008), а также для количественной оценки сообществ фитопланктона по таким показателям, как распределение клеток по размерам, жизнеспособность и метаболическая активность (Dashkova et al., 2017).

СЦ основана на регистрации флуоресценции и светорассеяния на небольшом участке поверхности, которая освещается узким пучком лазерного излучения при горизонтальном сканировании (Kamentsky, Kamentsky, 1991). В известной мере это аналог ПЦ, который позволяет исследовать образцы клеток не в суспензии, а находящиеся на плоской поверхности, например, на предметном стекле для микроскопии, в лунке планшета для культивирования клеток, на мембранном фильтре и т.п. Это обеспечивает ряд преимуществ по сравнению с ПЦ, например, возможность работать с небольшими образцами, исследовать морфологию клеток, проводить исследования *in situ*. СЦ нашла широкое применение преимущественно в исследованиях клеток человека и животных (Pozarowski et al., 2013). Примеров применения СЦ в микробиологии сравнительно немного. Так, например, разработаны методики количественного учета бактерий и грибов в различных природных образцах (Vanhee et al., 2010) и бактерий в питьевой воде (Baudart et al., 2004) с использованием СЦ на мембранных фильтрах. Есть также аналогичные методики количественного учета микобактерий в клинических образцах (Pina-Vaz et al., 2004) и *Staphylococcus xylosus* в био пленках на стеклянных поверхностях (Regina et al., 2012). Метод СЦ был использован совместно с микрофлуориметрией индивидуальных клеток *Cryptococcus neoformans* для оценки содержания в них ДНК, окрашенной йодидом пропидия, при изучении клеточного цикла этих дрожжей. Метод микрофлуориметрии позволил проследить динамику синтеза ДНК по стадиям развития, а СЦ оценить соотношение клеток на разных стадиях клеточного цикла в популяции (Yamaguchi et al., 2007).

НАНО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ВТОРИЧНЫХ ИОНОВ

Метод нано масс-спектрометрии вторичных ионов, nano SIMS (nano Secondary Ion Mass Spectrometry), позволяет характеризовать наличие тех или иных химических соединений в исследуемых объектах в координатах плоскости с разрешением в нанометровом диапазоне (получать “химическое изображение” объекта). Это осуществляется с помощью уникальных приборов, основанных на масс-спектрометрии вторичных ионов – так называемых ионных микроскопов и ионных микрозондов. В приборах первого типа образец “бомбардируется” первичными ионами по всей по-

верхности одновременно, во втором – в сканирующем режиме очень узким пучком. В качестве первичных ионов используют ионы цезия (Cs^+) и кислорода (O^-). Возникающие под ударом первичных ионов “осколки” разрушенных молекул образца – вторичные ионы, разделяются в детекторе масс-спектрометра по массе и регистрируются в виде спектра масс. Причем все эти данные у обоих типов приборов находятся в строгом соответствии с координатами плоскости образца. Если в образце имеются компоненты, имеющие пространственно-упорядоченную структуру, как например, клетки микроорганизмов, то после специальной компьютерной обработки данных, получается их “химическое изображение” по специфическому составу вторичных ионов. Кроме того приборы оснащены микроскопом, что позволяет сопоставлять “химическое изображение” с оптическим изображением (Gao et al., 2016; Nuñez et al., 2017). Применение nano SIMS в изучении микроорганизмов на уровне единичных клеток достаточно полно отражено в обзоре (Gao et al., 2016). Поэтому мы ограничимся лишь двумя примерами для иллюстрации возможностей метода. Первый пример – это исследование динамики размножения единичных бактерий *Staphylococcus aureus* непосредственно в мокроте пациентов с кистозным фиброзом (Kopf et al., 2016). Подход был основан на мечении дейтерием ($^2\text{H}_2\text{O}$) вновь синтезируемых разветвленных насыщенных C_{14} и C_{16} жирных кислот с параллельным анализом специфичности в отношении *S. aureus* методом FISH. Была обнаружена выраженная гетерогенность клеток *S. aureus* по времени генерации, причем медиана исследованной популяции *in situ* по этому показателю оказалась существенно меньше измеренного ранее *in vitro* предела скоростей для патогенов кистозного фиброза. Авторы подчеркивают значимость данных, полученных *in situ* на единичных клетках, для выбора правильной стратегии химиотерапии при кистозном фиброзе.

Второй пример связан с изучением экологии микроорганизмов. Исследовали количественные физиологические характеристики индивидуальных бактериальных клеток *Chromatium okenii*, *Lamprocystis purpurea* и *Chlorobium clathratiforme* экосистемы олиготрофного меромиктического озера (Musat et al., 2008). Для этого был разработан подход, также как и в предыдущем примере основанный на сопряжении nano SIMS и молекулярной идентификации с помощью FISH. Метаболическую активность характеризовали по ассимиляции $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ и $^{15}\text{NH}_4^+$. Было установлено, что в популяциях клеток каждого вида существует гетерогенность по метаболической активности. Еще одним любопытным наблюдением было обнаружение того, что клетки *C. okenii*, составляю-

щие менее 0.3% популяции обеспечивали более 40% потребления аммония и 70% общего потребления углерода в системе. Этот результат особенно ярко иллюстрирует принципиальную значимость и перспективность исследований экофизиологии микроорганизмов на уровне индивидуальных клеток, в частности с помощью методов nano SIMS.

КОЛЕБАТЕЛЬНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Колебательная спектроскопия позволяет регистрировать спектры квантовых переходов между колебательными уровнями энергии молекул после возбуждения фотонами света. Колебательные спектры регистрируют с помощью инфракрасной спектроскопии (ИКС) и рамановской спектроскопии (РС) (названа так в честь Ч.В. Рамана, впервые описавшего феномен неупругого рассеяния света; в российской литературе часто используются термином “спектроскопия комбинационного рассеяния”).

ИКС позволяет измерять спектры поглощения инфракрасного излучения, обусловленные колебательными энергетическими переходами в молекулах. В основе РС лежит эффект так называемого неупругого рассеяния света. При отражении от молекул основная часть света рассеивается в виде так называемого упругого (рэлеевского) рассеяния. При этом спектр отраженного света не изменяется. Однако небольшая часть фотонов претерпевает неупругое отражение вследствие взаимодействия с молекулами, которое связано с колебательными энергетическими переходами, и у них изменяются спектральные свойства. Это излучение и регистрируется в виде рамановского спектра. Следует подчеркнуть, что ИКС и РС несут информацию о разных колебательных переходах молекул: поглощение инфракрасного света определяется изменениями электрического момента молекулы в ходе поглощения, а интенсивность рамановского рассеяния зависит от того, как меняется поляризуемость молекулы при возникновении колебания. Изменения поляризуемости и изменение электрического момента могут быть по-разному выражены при различных колебаниях. Поэтому эти колебания по-разному представлены в ИКС и РС. В частности, полярные группы органических соединений ($\text{C}=\text{O}$, $\text{N}-\text{H}$, $\text{O}-\text{H}$) хорошо выражены в инфракрасных спектрах, а неполярные группы ($\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{C}$, $\text{S}-\text{S}$) лучше видны в рамановских спектрах (Ferraro et al., 2003; Stuart, 2004).

ИКС и РС уже давно применяют для характеристики многоклеточных микробных препаратов с использованием стандартных приборов, получая усредненные данные о химическом составе основных компонентов микробных клеток в популяции. Примером может служить использование этих методов для идентификации на уровне

рода, вида и даже подвида, поскольку колебательные спектры микроорганизмов являются своего рода их “отпечатками пальцев” (Lu et al., 2011). Есть работы, в которых ИКС и РС использовали для изучения развития бактериальных биопленок, механизмов повреждения клеток, чувствительности к антибиотикам и ряд других (Lu et al., 2011; Santos et al., 2015).

Разработано несколько методов, которые могут быть использованы для исследования единичных клеток микроорганизмов с использованием РС (микро-РС): SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy), TERS (Tip-Enhanced Raman Spectroscopy), CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) и RRS (Resonance Raman Spectroscopy) (Li et al., 2012; Harrison, Berry, 2017). Учитывая, что рамановское рассеяние – это очень слабое по интенсивности излучение, то все эти методы используют те или иные приемы для усиления регистрируемых сигналов. Основным достоинством TERS является возможность регистрировать РС с пространственным разрешением ниже оптического дифракционного предела (Domke, Pettinger, 2010). Так, в частности, показано применение TERS для изучения поверхностных структур, в том числе динамики полисахаридов и пептидов у бактерий (Neugebauer et al., 2007), а также для идентификации бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток (Neugebauer et al., 2007; Harz et al., 2009). Усиление сигнала рамановского рассеяния также может быть достигнуто с использованием облучения ультрафиолетовым светом. Нуклеиновые кислоты и белки по остаткам ароматических аминокислот у бактерий исследовали именно этим методом в ходе развития клеток по фазам роста (Neugebauer et al., 2007).

С помощью микро-РС можно получать так называемые “рамановские изображения” (Raman imaging) микроорганизмов подобно “химическим изображениям” при папо SIMS (см. предыдущий раздел) в условиях *in situ* или *in vivo* (Li et al., 2012; Harrison, Berry, 2017). Так, например, с учетом таксономической специфичности рамановских спектров (см. выше) благодаря применению RRS и специальных методов математической статистики показана возможность идентифицировать и локализовать *Mycobacterium gordonae* в макрофагах (Silge et al., 2007), идентифицировать, локализовать и даже определить физиологическое состояние разных популяций *S. aureus* в клетках эндотелия (Große et al., 2015). Методы RRS и SERS использовали для визуализации ризосферных бактерий *Pantoea* sp. YR343 на поверхности корневой *Arabidopsis thaliana* (Polisetti et al., 2016).

Особый интерес представляет применение микро-РС в сочетании с зондированием стабильными изотопами, Raman-SIP (Raman Stable Isotope Probing) (Wang et al., 2016). Метод основан на

том, что замена какого-нибудь атома его изотопом в химическом соединении приводит к сдвигу характерных полос данного атома в рамановском спектре. Это открывает возможность изучения метаболизма определенных соединений путем введения в исследуемую систему субстратов, меченных стабильными изотопами. В случае изучения метаболизма целых клеток микроорганизмов в качестве меченых стабильными изотопами метаболитов в среду культивирования вносят различные субстраты. К настоящему времени исследована возможность применения субстратов меченых изотопами ^{13}C , ^{15}N и ^2H . Причем наиболее значимые результаты пока получены в основном с ^{13}C - и ^2H -аналогами природных субстратов.

Учитывая отсутствие или большую стоимость разнообразных ^{13}C -субстратов, был разработан оригинальный подход, основанный на обратном замещении ^{13}C -метаболитов природными ^{12}C -метаболитами (Wang et al., 2016a). Этот метод был использован при изучении симбиотических взаимоотношений бактерий *Acinetobacter baylyi* ADP1 и *E. coli* DH5 α -GFP. Исходно клетки выращивали с коммерчески доступной ^{13}C -D-глюкозой в качестве субстрата с добавлением D $_2$ O. После ^{13}C и ^2H мечения обоих штаммов клетки инкубировали с ^{12}C -цитратом. С помощью микро-РС было установлено, что клетки *E. coli* DH5 α -GFP, не утилизирующие цитрат в монокультуре, приобретали эту способность в присутствии клеток *A. baylyi* ADP1. Дополнительные исследования с использованием масс-спектрометрии позволили предположить, что экскретируемые *A. baylyi* ADP1 путресцин и фенилаланин могут быть стимуляторами анаболизма цитрата *E. coli* DH5 α -GFP.

Еще одно перспективное направление использования микро-РС связано с препаративным выделением отдельных клеток, обладающих определенными свойствами, RACS (Raman Activated Cell Sorting). Достоинствами этого подхода являются неинвазивность, отсутствие дополнительных химических обработок таких, как, например, флуоресцентное зондирование при FACS (см. раздел “Цитометрия”), а также возможность осуществлять выделение клеток, идентифицируемых по определенному химическому составу метаболитов (химическим “отпечаткам пальцев”). Однако развитие этой методологии сдерживается техническими трудностями, связанными главным образом с низкой интенсивностью рамановского светорассеяния и необходимостью регистрации спектров со скоростью, обеспечивающей возможность физического разделения клеток по определенным признакам в реальном масштабе времени (Pahlow et al., 2015; Song et al., 2016).

В качестве успешного применения выделения клеток бактерий с помощью RACS приведем два примера, в которых в качестве признака для пре-

Таблица 1. Основные методы количественного анализа бактерий и дрожжей на уровне единичных клеток*

Метод	Разновидность метода	Структурный уровень анализа	Исследованные микроорганизмы	Анализируемые свойства	Источники литературы
Оптическая микроскопия, сопряженная с компьютерным анализом изображений	Микроскопия в проходящем свете	Клеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Niven et al., 2006; Wang et al., 2010a; Dazzo, Niccum, 2015; Balomenos et al., 2017; Gangan, Athale, 2017; Dazzo et al., 2017; Yu et al., 2011; Liu et al., 2011
	Флуоресцентная микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Морфометрические показатели Метаболические реакции Жизнеспособность Внутриклеточная локализация белков, в том числе в динамике Динамика транскрипции Динамика трансляции	Ogawa et al., 2005 Schulze et al., 2011 Yao, Carballido-López, 2014; Uphoff, 2016; Schneider, Basler, 2016; Cortesi et al., 2017 Stracy, Kapranidis, 2017 Gahlmann, Moerter, 2014
Сканирующая зондовая микроскопия	Сканирующая электрохимическая микроскопия	Клеточный, субклеточный	Дрожжи	Морфометрические показатели	Ohya et al., 2005; Negishi et al., 2009; Han et al., 2011; Gebre et al., 2015
				Жизнеспособность	Puchkov, 2014
	Сканирующая атомно-силовая микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Внутриклеточная локализация белков, в том числе в динамике	Chong et al., 2012; Bjerling et al., 2012; Day et al., 2016
				Вязкость в вакуолях	Puchkov, 2016
Сканирующая атомно-силовая микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Электрохимические свойства поверхности клеток в биопленках	Koley et al., 2011; Liu et al., 2011; Abucayon et al., 2014; Connella et al., 2014; Zoski, 2016	
			Структура полисахаридов, пептидо-гликана, тейхоевых кислот, пилей, жгутиков и других компонентов поверхности клеток	Dorobantu et al., 2012; Dufrière, 2014; Angeloni et al., 2016	
Сканирующая атомно-силовая микроскопия	Клеточный, субклеточный, молекулярный	Бактерии	Изолированные надмолекулярные комплексы	Пространственная организация химических групп и зарядов на поверхности клеток, а также силы взаимодействия клеток между собой, с различными лигандами и поверхностями	Dorobantu et al., 2012; Huang et al., 2015; Ott et al., 2017; Herman-Bausier et al., 2017
				Пространственная организация белков	Sutter et al., 2016

Таблица 1. Окончание

Метод	Разновидность метода	Структурный уровень анализа	Исследованные микроорганизмы	Анализируемые свойства	Источники литературы	
Цитометрия	Проточная цитометрия	Клеточный	Бактерии, дрожжи	Гетерогенность популяций	Avery, 2006; Wilkinson, 2015	
				Жизнеспособность	Juzwa et al., 2016; Emerson et al., 2017	
	Препаративная проточная цитометрия	Клеточный	Бактерии	Физиологические реакции	Ambriz-Aviña et al., 2014	
				Экология	Czechowska et al., 2008; Wang et al., 2010; Emerson et al., 2017	
Нано масс-спектрометрия вторичных ионов	Проточная цитометрия с визуализацией	Клеточный	Бактерии	Выделение бактерий с определенными свойствами	Wang et al., 2009; Chen et al., 2011	
				Интернализация фагоцитами	Phanse et al., 2012; Drechsler-Hake et al., 2016; Smirnov et al., 2017; Haridas et al., 2017	
	Сканирующая цитометрия	Клеточный	Дрожжи	Интернализация фагоцитами	Okagaki et al., 2010	
				Морфометрические показатели	Calvert et al., 2008	
	Микро-рамановская спектроскопия (микро-спектроскопия комбинационного рассеяния)	Клеточный, субклеточный	Бактерии	Морфометрические показатели	Baudart et al., 2004; Pina-Vaz et al., 2004; Vanhee et al., 2010; Regina et al., 2012	
				Содержание ДНК	Yamaguchi et al., 2007	
	Колебательная спектроскопия	Клеточный	Бактерии	Отдельные метаболиты	Musat et al., 2008; Gao et al., 2016; Kopf et al., 2016; Nuñez et al., 2017	
				Спектральная характеристика клеток по составу пептидов, белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, в том числе с субклеточным пространственным разрешением	Neugebauer et al., 2007; Silge et al., 2007; Harz et al., 2009; Große et al., 2015; Wang et al., 2016; Harrison, Betty, 2017	
		Препаративное разделение клеток по рамановским спектрам	Клеточный	Дрожжи	Спектральная характеристика клеток по составу пептидов, белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот, в том числе с субклеточным пространственным разрешением	Harz et al., 2009; Harrison, Betty, 2017
					Выделение бактерий с определенными свойствами рамановского спектра	McIlvenna et al., 2016; Song et al., 2017

* В таблицу включены методы, описанные в настоящем обзоре. С иными возможностями применения этих и некоторых других методов, представленных в публикациях до 2004 г., можно ознакомиться в обзорах (Sharigo, 2000; Brehm-Stecher, Johnson, 2004).

паративной сортировки клеток использовали хорошо выраженную спектральную полосу каротиноидов. Первый пример связан с использованием микропроточной системы RACS, которая была разработана для непрерывного разделения каротиноид-содержащих бактерий. В качестве модельного объекта использовали цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC6803. Показана возможность разделения клеток, культивированных на ^{12}C - и ^{13}C -субстратах и содержащих, соответственно, ^{12}C - и ^{13}C -каротиноиды, с эффективностью 96.3% (McIlvenna et al., 2016). В другой работе проводилось разделение бактерий в образцах морской воды Красного моря с помощью RACS. При этом идентификация также была основана на спектрах каротиноидов, но разделение клеток производилось с использованием, так называемого клеточного выталкивания (cell ejection) с подложки, на которой фиксировались клетки. С помощью последующего геномного анализа изолированных клеток были выявлены новые функциональные гены, кодирующие биосинтез каротиноидов и изопреноидов, а также ранее неизвестные фототрофные микроорганизмы, включая некультивируемые *Cyanobacteria* spp. (Song et al., 2017).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени в руках микробиологов имеется большой набор методов изучения физико-химических свойств единичных клеток микроорганизмов (табл. 1). Все эти методы основаны на разных принципах и, соответственно, позволяют осуществлять многостороннюю характеристику микробных клеток: это открывает перспективу по-новому подойти к решению многих фундаментальных и прикладных проблем.

Методы количественного анализа единичных клеток лежат в основе изучения природы гетерогенности микробных популяций. С помощью этих методов уже получены уникальные сведения о структурно-функциональной организации бактерий и дрожжей на молекулярном уровне, в том числе в динамике. В сочетании с методами геномики появилась возможность изучения некультивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов (Solden et al., 2016) непосредственно *in situ*. Ведутся работы по использованию данных, полученных на единичных клетках микроорганизмов, в исследованиях по системной и синтетической биологии, а также для информационной технологии глубинного анализа данных (data mining). Количественный анализ взаимодействия единичных микробных клеток с клетками макроорганизмов, несомненно, сыграет важную роль в изучении и лечении инфекционных заболеваний.

Фронт работ по разработке и применению методов количественного анализа единичных клеток

микроорганизмов на клеточном и субклеточном уровне так широк, что его даже стали выделять как самостоятельное направление — “микробиология единичных клеток” (single-cell microbiology) (Brehm-Stecher, Johnson, 2004). Дальнейшее развитие этого направления, включая совершенствование его методической составляющей, несомненно, будет способствовать углублению наших представлений о мире микробов. Хороших методов в экспериментальной науке не может быть слишком много!

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пучков Е.О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме // Биологические мембраны. 2014. Т. 31. С. 3–13.
- Puchkov E.O. Intracellular viscosity: methods of measurement and role in metabolism // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 2013. V. 7. № 4. P. 270–279. <http://dx.doi.org/doi10.1134/s19907478-13050140>.
- Пучков Е.О. Межклеточная сигнализация в мире микроорганизмов: панорамный вид // Биологические мембраны. 2016. Т. 33. С. 32–42.
- Puchkov E.O. Intercellular signaling in microbial world: A panoramic view // Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology. 2016. V. 10. № 1. P. 1–10.
- Abucayon E., Ke N., Cornut R., Patelunas A., Miller D., Nishiguchi M.K., Zoski C.G. Investigating catalase activity through hydrogen peroxide decomposition by bacteria biofilms in real time using scanning electrochemical microscopy // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 498–505. doi 10.1021/ac402475m
- Agrawal U., Reilly D.T., Schroeder C.M. Zooming in on biological processes with fluorescence nanoscopy // Curr. Opin. Biotechnol. 2013. V. 24. P. 646–653. <http://dx.doi.org/doi10.1016/j.copbio.2013.02.016>.
- Ambriž-Aviña V., Contreras-Garduño J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. ID 461941. doi 10.1155/2014/461941
- Angeloni L., Passeri D., Reggente M., Pantanella F., Mantovani D., Rossi M. Microbial cells force spectroscopy by atomic force microscopy: A review // Nanosci. Nanometrol. 2016. V. 2. P. 30–40. doi 10.11648/j.nsnm.20160201.13
- Avery S.V. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. P. 577–587.
- Balomenos A.D., Tsakanikas P., Aspidou Z., Tampakaki A.P., Koutsoumanis K.P., Manolakos E.S. Image analysis driven single-cell analytics for systems microbiology // BMC Syst. Biol. 2017. V. 11. P. 43. doi 10.1186/s12918-017-0399-z
- Barteneva N.S., Fasler-Kan E., Vorobjev I.A. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems // J. Histochem. Cytochem. 2012. V. 60. P. 723–733.
- Baudart J., Olaižola A., Coallier J., Gauthier V., Laurent P. Assessment of a new technique combining a viability test,

- whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable *Enterobacteriaceae* cells in drinking water // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 243. P. 405–409.
- Bhushan B., Marti O.* Scanning probe microscopy – Principle of operation, instrumentation and probes // *Nanotribology and Nanomechanics* / Ed. Bhushan B. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. Ch. 2. P. 37–110. doi 10.1007/978-3-642-15283-2_2
- Bjerling P., Olsson I., Meng X.* Quantitative live cell fluorescence-microscopy analysis of fission yeast // *J. Visual. Exper.* 2012. V. 59. e3454. <http://dx.doi.org/10.3791/3454>.
- Bobik T.A., Lehman B.P., Yeates T.O.* Bacterial microcompartments: widespread prokaryotic organelles for isolation and optimization of metabolic pathways // *Mol. Microbiol.* 2015. V. 98. P. 193–207. <https://doi.org/10.1111/mmi.13117>.
- Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A.* Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. V. 68. P. 538–559.
- Calvert M.E., Lannigan J.A., Pemberton L.F.* Optimization of yeast cell cycle analysis and morphological characterization by multispectral imaging flow cytometry // *Cytometry A.* 2008. V. 73. P. 825–833. doi 10.1002/cyto.a.20609
- Chen C.H., Cho S.H., Chiang H.I., Tsai F., Zhang K., Lo Y.H.* Specific sorting of single bacterial cells with microfabricated fluorescence-activated cell sorting and tyramide signal amplification fluorescence in situ hybridization // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 7269–7275. doi 10.1021/ac2013465
- Chen S.-C., Zhao T., Gordon G.J., Murphy R.F.* Automated image analysis of protein localization in budding yeast // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. P. i66–i71. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm206>.
- Choi H., Rangarajan N., Weisshaar J.C.* Lights, camera, action! Antimicrobial peptide mechanisms imaged in space and time // *Trends Microbiol.* 2016. V. 24. P. 111–122. doi 10.1016/j.tim.2015.11.004
- Chong Y.T., Cox M.J., Andrews B.* Proteome-wide screens in *Saccharomyces cerevisiae* using the yeast GFP collection // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 736. P. 169–178. doi 10.1007/978-1-4419-7210-1_8
- Connella J.L., Kimb J., Shearb J.B., Bardb A.J., Whiteleya M.* Real-time monitoring of quorum sensing in 3D-printed bacterial aggregates using scanning electrochemical microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 18255–18260. doi 10.1073/pnas.1421211111
- Cortesi M., Bandiera L., Pasini A., Bevilacqua A., Gherardi A., Furini S., Giordano E.* Reliable measurement of *E. coli* single cell fluorescence distribution using a standard microscope set-up // *J. Biol. Eng.* 2017. V. 11. № 8. doi 10.1186/s13036-017-0050-y
- Czechowska K., Johnson D.R., van der Meer J.R.* Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. P. 205–212. doi 10.1016/j.mib.2008.04.006
- Dashkova V., Malashenkov D., Poulton N., Vorobjev I., Barteneva N.S.* Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis // *Methods.* 2017. V. 112. P. 188–200. doi 10.1016/j.ymeth.2016.05.007
- Dazzo F.B.* CMEIAS-aided microscopy of the spatial ecology of individual bacterial interactions involving cell-to-cell communication within biofilms // *Sensors.* 2012. V. 12. P. 7047–7062. doi 10.3390/s120607047
- Dazzo F.B., Niccum B.C.* Use of CMEIAS image analysis software to accurately compute attributes of cell size, morphology, spatial aggregation and color segmentation that signify *in situ* ecophysiological adaptations in microbial biofilm communities // *Computation.* 2015. V. 3. P. 72–98.
- Dazzo F.B., Sexton R., Jain A., Makhoul A., Shears M., Gusfa D., Handelsman S., Niccum B., Onsay D.* Influence of substratum hydrophobicity on the geomicrobiology of river biofilm architecture and ecology analyzed by CMEIAS bioimage informatics // *Geosciences.* 2017. V. 7. № 56. P. 1–36. doi 10.3390/geosciences7030056
- Dekel E., Rivkin A., Heidenreich M., Nadav Y., Ofir-Birin Y., Porat Z., Regev-Rudzki N.* Identification and classification of the malaria parasite blood developmental stages, using imaging flow cytometry // *Methods.* 2017. V. 112. P. 157–166. doi 10.1016/j.ymeth.2016.06.021
- Domke K.F., Pettinger B.* Studying surface chemistry beyond the diffraction limit: 10 years of TERS // *Chemphyschem.* 2010. V. 11. P. 1365–1373. doi 10.1002/cphc.200900975
- Dorobantu L.S., Goss G.G., Burrell R.E.* Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces // *Micron.* 2012. V. 43. P. 1312–1322. doi 10.1016/j.micron.2012.05.005
- Drechsler-Hake D., Alamir H., Hahn J., Günter M., Wagner S., Schütz M., Bohn E., Schenke-Layland K., Pisano F., Dersch P., Autenrieth I.B., Autenrieth S.E.* Mononuclear phagocytes contribute to intestinal invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* // *Int. J. Med. Microbiol.* 2016. V. 306. P. 357–366. doi 10.1016/j.ijmm.2016.04.002
- Dufrêne Y.F.* Atomic force microscopy in microbiology: new structural and functional insights into the microbial cell surface // *MBio.* 2014. V. 5. P. e01363-14. doi 10.1128/mBio.01363-14
- Emerson J.B., Adams R.I., Román C.M.B., Brooks B., Coil D.A., Dahlhausen K., Ganz H.H., Hartmann E.M., Hsu T., Justice N.B., Paulino-Lima I.G., Luongo J.C., Lymperopoulou D.S., Gomez-Silvan C., Rothschild-Mancinelli B., Balk M., Huttenhower C., Nocker A., Vaishampayan P., Rothschild L.J.* Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems // *Microbiome.* 2017. V. 5. P. 86. doi 10.1186/s40168-017-0285-3
- Ferraro J., Nakamoto K., Brown C.W.* Introductory Raman Spectroscopy. 2nd ed. Elsevier, 2003. 434 p.
- Gahlmann A., Moerner W.E.* Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. P. 9–22. doi 10.1038/nrmicro3154
- Gangan M.S., Athale C.A.* Threshold effect of growth rate on population variability of *Escherichia coli* cell lengths // *R. Soc. Open Sci.* 2017. V. 4. P. 160417. doi 10.1098/rsos.160417

- Gao D., Huang X., Tao Y. A critical review of NanoSIMS in analysis of microbial metabolic activities at single-cell level // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36. P. 884–890. doi 10.3109/07388551.2015.1057550
- Gebre A.A., Okada H., Kim C., Kubo K., Ohnuki S., Ohya Y. Profiling of the effects of antifungal agents on yeast cells based on morphometric analysis // *FEMS Yeast Res.* 2015. V. 15. fov040. <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov040>.
- Große C., Bergner N., Dellith J., Heller R., Bauer M., Mellmann A., Popp J., Neugebauer U. Label-free imaging and spectroscopic analysis of intracellular bacterial infections // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. P. 2137–2142. doi 10.1021/ac503316s
- Han J., Kamber M., Pei J. *Data Mining: Concepts and Techniques*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. 744 p.
- Haridas V., Ranjbar S., Vorobjev I.A., Goldfeld A.E., Barteneva N.S. Imaging flow cytometry analysis of intracellular pathogens // *Methods.* 2017. V. 112. P. 91–104. doi 10.1016/j.ymeth.2016.09.007
- Harrison J.P., Berry D. Vibrational spectroscopy for imaging single microbial cells in complex biological samples // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 675. doi 10.3389/fmicb.2017.00675
- Harz M., Rösch P., Popp J. Vibrational spectroscopy – a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level // *Cytometry A.* 2009. V. 75. P. 104–113. doi 10.1002/cyto.a.20682
- Hennig H., Rees P., Blasi T., Kamensky L., Hung J., Dao D., Carpenter A.E., Filby A. An open-source solution for advanced imaging flow cytometry data analysis using machine learning // *Methods.* 2017. V. 112. P. 201–210. doi 10.1016/j.ymeth.2016.08.018
- Herman-Bausier P., Formosa-Dague C., Feuille C., Valotteau C., Dufrêne Y.F. Forces guiding staphylococcal adhesion // *J. Struct. Biol.* 2017. V. 197. P. 65–69. doi 10.1016/j.jsb.2015.12.009
- Herzenberg L.A., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg L.A. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford // *Clin. Chem.* 2002. V. 48. P. 1819–1827.
- Huang Q., Wu H., Cai P., Fein J.B., Chen W. Atomic force microscopy measurements of bacterial adhesion and biofilm formation onto clay-sized particles // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 16857. doi 10.1038/srep16857
- Ishii S., Tago K., Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. P. 1281–1292. doi 10.1007/s00253-010-2524-4
- James S.A., Hilal N., Wright C.J. Atomic force microscopy studies of bioprocess engineering surfaces – imaging, interactions and mechanical properties mediating bacterial adhesion // *Biotechnol. J.* 2017. V. 12. P. 7. doi 10.1002/biot.201600698
- Juzwa W., Duber A., Myszkka K., Białas W., Czaczuk K. Identification of microbes from the surfaces of food-processing lines based on the flow cytometric evaluation of cellular metabolic activity combined with cell sorting // *Biofouling.* 2016. V. 32. P. 841–851. doi 10.1080/08927014.2016.1201657
- Kamensky L.A., Kamensky L.D. Microscope-based multi-parameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data // *Cytometry.* 1991. V. 12. P. 381–387.
- Koley D., Ramsey M.M., Bard A.J., Whiteley M. Discovery of a biofilm electroline using real-time 3D metabolite analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 19996–20001. doi 10.1073/pnas.1117298108
- Kopf S.H., Sessions A.L., Cowley E.S., Reyes C., Van Sambeek L., Hu Y., Orphan V.J., Kato R., Newman D.K. Trace incorporation of heavy water reveals slow and heterogeneous pathogen growth rates in cystic fibrosis sputum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. E110–6. doi 10.1073/pnas.1512057112
- Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Berlin: Springer Science and Business Media, 2006. 871 p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.
- Li M., Xu J., Romero-Gonzalez M., Banwart S.A., Huang W.E. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2012. V. 23. P. 56–63.
- Liu J., Dazzo F.B., Glagoleva O., Yu B., Jain A.K. CMEIAS: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities // *Microbial Ecol.* 2001. V. 41. P. 173–194. <http://dx.doi.org/10.1007/s002480000004>.
- Liu Y., Aubrey W., Martin K., Sparkes A., Lu C., King R.D. The analysis of yeast cell morphology features in exponential and stationary phase // *J. Biol. Systems.* 2011. V. 19. P. 561–575. <http://dx.doi.org/doi.10.1142/S0218339011003968>.
- Liua X., Ramsey M.M., Chena X., Koleya D., Whiteley M., Bard A.J. Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 72668–72673. doi 10.1073/pnas.1018391108
- Lower S.K. Atomic force microscopy to study intermolecular forces and bonds associated with bacteria // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 715. P. 285–299. doi 10.1007/978-94-007-0940-9_18
- Lu X., Al-Qadiri H.M., Lin M., Rasco B.A. Application of mid-infrared and Raman spectroscopy to the study of bacteria // *Food Bioproc. Technol.* 2011. V. 4. P. 919–935. doi 10.1007/s11947-011-0516-8
- McIlvenna D., Huang W.E., Davison P., Glidle A., Cooper J., Yin H. Continuous cell sorting in a flow based on single cell resonance Raman spectra // *Lab Chip.* 2016. V. 16. P. 1420–1429. doi 10.1039/c6lc00251j
- Minoshima M., Kikuchi K. Photostable and photoswitching fluorescent dyes for super-resolution imaging // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017. V. 22. P. 639–652. doi 10.1007/s00775-016-1435-y
- Mulvihill D.P. Live cell Imaging in fission yeast // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2017. V. 2017. № 10. <https://doi.org/10.1101/pdb.top090621>.
- Musat N., Halm H., Winterholler B., Hoppe P., Peduzzi S., Hillion F., Horreard F., Amann R., Jørgensen B.B., Kuypers M.M.M. A single-cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria // *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA. 2008. V. 105. P. 17861–17866. doi.org/10.1073/pnas.0809329105
- Negishi T., Nogami S., Ohya Y. Multidimensional quantification of subcellular morphology of *Saccharomyces cerevisiae* using CalMorph, the high-throughput image-processing program // J. Biotechnol. 2009. V. 141. P. 109–117. http://dx.doi.org/ doi 10.1016/j.jbiotec.2009.03.014.
- Neugebauer U., Schmid U., Baumann K., Ziebuhr W., Kozitskaya S., Deckert V., Schmitt M., Popp J. Towards a detailed understanding of bacterial metabolism – spectroscopic characterization of *Staphylococcus epidermidis* // Chemphyschem. 2007. V. 8. P. 124–137.
- Niven G.W., Fuks T., Morton J.S., Rua S.A., Mackey B.M. A novel method for measuring lag times in division of individual bacterial cells using image analysis // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 65. P. 311–317. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.08.006
- Núñez J., Renslow R., Cliff J.B. 3rd, Anderton C.R. NanoSIMS for biological applications: Current practices and analyses // Biointerphases. 2017. V. 13. № 3. P. 03B301. doi 10.1116/1.4993628
- Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N., Nasu M. Development of multicolour digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water // J. Appl. Microbiol. 2003. V. 95. P. 120–128. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01950.x.
- Ogawa M., Tani K., Ochiai N., Yamaguchi N., Nasu M. Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 98. P. 1101–1106. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02551.x.
- Ohtani M., Saka A., Sano F., Ohya Y., Morishita S. Development of image processing program for yeast cell morphology // J. Bioinform. Computat. Biol. 2004. V. 1. P. 695–709. http://dx.doi.org/10.1142/S0219720004000363.
- Ohya Y., Sese J., Yukawa M., Sano F., Nakatani Y., Saito T.L., Saka A., Fukuda T., Ishihara S., Oka S., Suzuki G., Watanabe M., Hirata A., Ohtani M., Sawai H., Frayse N., Latgé J.P., François J.M., Aebi M., Tanaka S., Muramatsu S., Araki H., Sonoike K., Nogami S., Morishita S. High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 19015–19020. http://dx.doi.org/ doi 10.1073/pnas.0509436102.
- Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltes N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F., Nielsen K. Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity // PLoS Pathog. 2010. V. 6. № 6. doi 10.1371/annotation/1b59fd9e-9ac9-4ea8-a083-14c413c80b03
- Ott W., Jobst M.A., Schoeler C., Gaub H.E., Nash M.A. Single-molecule force spectroscopy on polyproteins and receptor-ligand complexes: The current toolbox // J. Struct. Biol. 2017. V. 197. P. 3–12. doi 10.1016/j.jsb.2016.02.011
- Pahlow S., Meisel S., Cialla-May D., Weber K., Rösch P., Popp J. Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2015. V. 89. P. 105–120. doi 10.1016/j.addr.2015.04.006
- Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Friend S.L., Carrillo-Conde B., Lueth P., Oster C.J., Phillips G.J., Narasimhan B., Wannemuehler M.J., Bellaire B.H. Analyzing cellular internalization of nanoparticles and bacteria by multi-spectral imaging flow cytometry // J. Vis. Exp. 2012. V. 8. № 64. P. e3884. doi 10.3791/3884
- Pina-Vaz C., Costa-Oliveira S., Rodrigues A.G., Salvador A. Novel method using a laser scanning cytometer for detection of mycobacteria in clinical samples // J. Clin. Microbiol. 2004. V. 42. P. 906–908.
- Polisetti S., Bible A.N., Morrell-Falvey J.L., Bohn P.W. Raman chemical imaging of the rhizosphere bacterium *Pantoea* sp. YR343 and its co-culture with *Arabidopsis thaliana* // Analyst. 2016. V. 141. P. 2175–2182. doi 10.1039/c6an00080k
- Pozarowski P., Holden E., Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications-an update // Methods Mol. Biol. 2013. V. 931. P. 187–212. doi 10.1007/978-1-62703-056-4_11
- Puchkov E.O. Computer image analysis as a tool for microbial viability assessment: examples of use and prospects // J. Biosci. Med. 2014. V. 2. P. 1–6. http://dx.doi.org/ doi 10.4236/jbm.2014.23001.
- Puchkov E. Microfluorimetry of single yeast cells by fluorescence microscopy combined with digital photography and computer image analysis // Advances in Medicine and Biology / Ed. Berhardt L.V. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2016. V. 98. Ch. 6. P. 69–90.
- Puchkov E. Image analysis in microbiology: a review // J. Comp. Commun. 2016a. V. 4. P. 8–32.
- Regina V.R., Poulsen M., Søhoel H., Bischoff C., Meyer R.L. Quantification of bacteria on abiotic surfaces by laser scanning cytometry: an automated approach to screen the anti-fouling properties of new surface coatings // J. Lab. Autom. 2012. V. 17. P. 293–301. doi 10.1177/2211068212450013
- Saito T.L., Ohtani M., Sawai H., Sano F., Saka A., Watanabe D., Yukawa M., Ohya Y., Morishita S. SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database // Nucleic Acid Res. 2004. V. 32. Database issue D319–D322. http://dx.doi.org/ doi 10.1093/nar/gkh113.
- Santos M.I., Gerbino E., Tymczynsyn E., Gomez-Zavaglia A. Applications of infrared and Raman spectroscopies to probiotic investigation // Foods. 2015. V. 4. P. 283–305. doi 10.3390/foods4030283
- Schneider J.P., Basler M. Shedding light on biology of bacterial cells // Phil. Trans. R. Soc. 2016. V. B 371. P. 20150499. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0499.
- Schulze K., López D.A., Tillich U.M., Frohme M. A Simple viability analysis for unicellular cyanobacteria using a new autofluorescence assay, automated microscopy, and imageJ // BMC Biotechnol. 2011. V. 11. P. 118–125. http://dx.doi.org/ doi 10.1186/1472-6750-11-118
- Shapiro H.M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques // J. Microbiol. Methods. 2000. V. 42. P. 3–16.
- Silge A., Abdou E., Schneider K., Meisel S., Bocklitz T., Lu-Walther H.W., Heintzmann R., Rösch P., Popp J. Shedding light on host niches: label-free *in situ* detection of *Mycobacterium gordonae* via carotenoids in macrophages by Raman microspectroscopy // Cell. Microbiol. 2015. V. 17. P. 832–842. doi 10.1111/cmi.12404

- Smirnov A., Solga M.D., Lannigan J., Criss A.K. High-throughput particle uptake analysis by imaging flow cytometry // *Curr. Protoc. Cytom.* 2017. V. 80. P. 11.22.1–11.22.17. doi 10.1002/cpsy.19
- Snapp E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology // *Curr. Prot. Cell Biol.* 2005. Unit–21.4. http://doi.org/10.1002/0471143030.cb2104s27.
- Solden L., Lloyd K., Wrighton K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016. V. 31. P. 217–226. doi 10.1016/j.mib.2016.04.020
- Song Y., Yin H., Huang W.E. Raman activated cell sorting // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2016. V. 33. P. 1–8. doi 10.1016/j.cbpa.2016.04.002
- Song Y., Kaster A.K., Vollmers J., Song Y., Davison P.A., Frentrup M., Preston G.M., Thompson I.P., Murrell J.C., Yin H., Hunter C.N., Huang W.E. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 125–137. doi 10.1111/1751-7915.12420
- Stracy M., Kapanidis A.N. Single-molecule and super-resolution imaging of transcription in living bacteria // *Methods.* 2017. V. 120. P. 103–114. doi 10.1016/j.ymeth.2017.04.001
- Stuart B.H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd., 2004. 244 p. doi 10.1002/0470011149
- Sutter M., Faulkner M., Aussignargues C., Paasch B.C., Barrett S., Kerfeld C.A., Liu L.N. Visualization of bacterial microcompartment facet assembly using high-speed atomic force microscopy // *Nano Lett.* 2016. V. 16. P. 1590–1595. doi 10.1021/acs.nanolett.5b04259
- Terahara N., Kodera N., Uchihashi T., Ando T., Namba K., Minamino T. Na⁺-induced structural transition of MotPS for stator assembly of the *Bacillus* flagellar motor // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. № 11. P.eaao4119. doi 10.1126/sciadv.aao4119
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Ann. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544.
- Uphoff S. Super-resolution microscopy and tracking of DNA-binding proteins in bacterial cells // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1431. P. 221–234. doi 10.1007/978-1-4939-3631-1_16
- Van Der Hofstadt M., Hüttener M., Juárez A., Gomila G. Nanoscale imaging of the growth and division of bacterial cells on planar substrates with the atomic force microscope // *Ultramicroscopy.* 2015. V. 154. P. 29–36. doi 10.1016/j.ultramicro.2015.02.018
- Vanhee L.M., D'Haese E., Cools I., Nelis H.J., Coenye T. Detection and quantification of bacteria and fungi using solid-phase cytometry // *Detection of bacteria, viruses, parasites and fungi. NATO science for peace and security series A: Chemistry and Biology.* Ed. Viola Magni M. Dordrecht: Springer, 2010. P. 25–41.
- Wang Y., Hammes F., Boon N., Chami M., Egli T. Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria // *ISME J.* 2009. V. 3. P. 889–902. doi 10.1038/ismej.46
- Wang Y., Hammes F., De Roy K., Verstraete W., Boon N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. P. 416–424. doi 10.1016/j.tibtech.2010.04.006
- Wang Y., Huang W.E., Cui L., Wagner M. Single cell stable isotope probing in microbiology using Raman microspectroscopy // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 41. P. 34–42. doi 10.1016/j.copbio.2016.04.018
- Wang P., Robert L., Pelletier J., Dang W.L., Taddei F., Wright A., Jun S. Robust growth of *Escherichia coli* // *Curr. Biol.* 2010a. V. 20. P. 1099–1103. doi 10.1016/j.cub.2010.04.045
- Wang Y., Song Y., Tao Y., Muhamadali H., Goodacre R., Zhou N.Y., Preston G.M., Xu J., Huang W.E. Reverse and multiple stable isotope probing to study bacterial metabolism and interactions at the single cell level // *Anal. Chem.* 2016a. V. 88. P. 9443–9450.
- Wilkinson M.G. *Flow Cytometry in Microbiology: Technology and Applications.* Caister Academic Press, 2015. 230 p. https://doi.org/doi 10.21775/9781910190111.
- Yamaguchi M., Ohkusu M., Biswas S.K., Kawamoto S. Cytological study of cell cycle of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* // *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2007. V. 48. № 4. P. 147–152.
- Yao Z., Carballido-López R. Fluorescence imaging for bacterial cell biology: from localization to dynamics, from ensembles to single molecules // *Annu. Rev. Microbiol.* 2014. V. 68. P. 459–476. doi 10.1146/annurev-micro-091213-113034
- Yu B.Y., Elbuken C., Ren C.L., Huissoon J.P. Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip // *J. Biomed. Optics.* 2011. V. 16. 066008. http://dx.doi.org/doi 10.1117/1.3589100.
- Zoski C.G. Review – Advances in scanning electrochemical microscopy (SECM) // *J. Electrochem. Soc.* 2016. V. 163. № 4. P. H3088–H3100. doi 10.1149/2.0141604jes

Quantitative Methods for Single-Cell Analysis of Microorganisms

E. O. Puchkov*

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: puchkov@ibpm.pushchino.ru

Received June 15, 2018

Revised September 27, 2018

Accepted October 2, 2018

Abstract—The present-day concepts of microbial life were significantly influenced by research at the population level. This approach stemmed from the necessity to overcome the sensitivity limitations of the physicochemical, molecular biological, and genetic approaches. Potential differences between microbial cells were leveled off, the properties of the cells were averaged, and the obtained results characterized the studied microbial population as a whole. However, some analytical techniques were perfected to the level when quantitative investigation of the physicochemical and morphological properties of individual cells became possible.

This made it possible to apply new approaches to a number of problems, including heterogeneity of microbial populations, the nature of uncultured and persistent forms, biofilm development, microbial interaction with plant and animal cells, relationship between structure and function in metabolism, etc. The present review provides a brief discussion on the methods of quantitative analysis of single bacterial and yeast cells at the cellular and subcellular level and examples of their application according to the literature data of the last 15 years.

Keywords: bacteria, yeasts, morphometry, biofilms, viability, heterogeneity, fluorescence microscopy, phase contrast microscopy, ultrahigh resolution microscopy, computerized image analysis, microfluorimetry, scanning probe microscopy, scanning electrochemical microscopy, scanning atomic force microscopy, microscopy of chemical forces, force spectroscopy of individual cells, force spectroscopy of individual molecules, flow cytometry, scanning cytometry, nanoscale mass spectrometry of secondary ions, micro-Raman spectroscopy