

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ,
БИОТЕХНОЛОГИЯ И АКВАКУЛЬТУРА

УДК 577.115.086:582.261/.263

DOI: [10.21072/eco.2023.27.05](https://doi.org/10.21072/eco.2023.27.05)

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ *

Соломонова Е. С., Железнова С. Н.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: solomonov83@mail.ru

Аннотация: Содержание липидов в клетках микроводорослей, принадлежащих к различным таксономическим группам и выращенных при разных условиях культивирования, определяли с помощью спектрофотометрического метода и метода проточной цитометрии в комбинации с флуорохромом нильский красный (NR) — флуоресцентным маркером нейтральных и полярных липидов в клетках водорослей. Показано, что все используемые в экспериментах культуры хорошо окрашивались нильским красным на разных стадиях роста, для идентификации липидов в клетках отмечена флуоресценция в оранжевой области спектра (канал FL2, 575 нм). Оптимальное время окраски составило 10 мин при добавлении рабочего раствора NR в культуральную среду (20 мкл на 1 мл культуры). Полученные результаты показали отсутствие существенной разницы между спектрофотометрическим и флуоресцентным методами определения содержания липидов в микроводорослях ($R^2 = 0,98$). Комбинирование стандартного спектрофотометрического метода и флуоресцентного, реализуемого путём окрашивания клеток NR, может служить надёжным подходом для оценки липидов в клетках микроводорослей.

Ключевые слова: липиды, микроводоросли, спектрофотометрический метод, проточная цитометрия, нильский красный.

Введение

Липиды выполняют важные функции в живых организмах: они представляют собой структурные компоненты мембраны клетки и органоидов, являясь сигнальными молекулами либо их предшественниками, участвуют в катаболизме для получения необходимой клетке энергии [Gurr, Harwood, Frayn, 2002]. В последнее время в практике гидробиологических исследований особое внимание уделяется липидам микроводорослей в связи с их высоким потенциалом в качестве сырья для фармацевтической, химической и пищевой промышленности [Hu et al., 2008]. Липиды ряда видов водорослей богаты ценными полиненасыщенными жирными кислотами, которые выполняют антибактериальную, противовоспалительную, антиоксидантную роль [Davey, Kell, 1996], ингибируют активность раковых клеток [Pereira et al., 2012]. Также липиды микроводорослей являются важным компонентом рациона как водных организмов [Brett, Müller-Navarra, 1997], так и человека, источником не только строительных блоков для клеточных мембран, но и предшественников сигнальных и регуляторных молекул [Shahidi, Ambigaipalan, 2018].

Прямые методы определения концентрации общих липидов в микроводорослях — гравиметрический [Руководство по ... , 2004; Bligh, Dyer, 1959] и спектрофотометрический [Руководство по ... , 2004; Wawrik, Harriman, 2010] занимают много времени, требуют как квалифицированных специалистов, так и дополнительного дорогостоящего оборудования.

*Исследование выполнено в рамках тем госзаданий № 1023121900003-0-1.6.16 и № 121030300149-0.

Трудоёмкость этих двух методов заключается в необходимости проведения многократной длительной экстракции липидов из микроводорослей смесью Фолча (не менее четырёх раз) до полного обесцвечивания биомассы [Руководство по ... , 2004] и в необходимости многократно (не менее трёх раз) промывать полученный липидный экстракт дистиллированной водой для удаления нелипидных примесей. Спектрофотометрический метод требует дальнейшей пробоподготовки, которая заключается в продолжительном кипячении липидов в серной кислоте для получения продуктов распада ненасыщенных кислот с последующим добавлением фосфованилинового реактива для непосредственного определения липидов. Всё это не только занимает много времени, но и главным образом приводит к ошибкам измерения.

Появление современных методов, в частности метода проточной цитометрии в комбинации с различными витальными красителями [Davey, Kell, 1996], даёт возможность быстрой и достаточно точной оценки липидного комплекса микроводорослей. В таких исследованиях для маркирования содержания липидов широко применяется флуоресцентный краситель нильский красный (Nile Red) [Cooksey et al., 1987; Elsey et al., 2007; Eltgroth, Watwood, Wolfe, 2005], который относится к так называемым флуоресцентным зондам, т. к. при добавлении к липидосодержащим клеткам его молекулы связываются с липидами, а из параметров флуоресценции можно извлечь определённую информацию о структуре и функции данных биологических объектов. Поскольку Nile Red (NR) имеет максимум возбуждения на длине волны 488 нм и излучается в диапазоне длин волн от 510 до 580 нм, он исключительно эффективен в проточной цитометрии. Этим и объясняется резкое увеличение числа работ, в которых окраску NR комбинировали с проточной цитометрией для определения липидов в клетках водорослей [Cooksey et al., 1987; de la Jara et al., 2003; Montero, Aristizábal, Reina, 2011; Satpati, Pal, 2015]. Перспективность этого подхода связана в первую очередь с высокой производительностью и точностью проточной цитометрии.

Однако в литературе встречаются многочисленные протоколы окрашивания микроводорослей, согласно которым необходимо: а) строго контролировать добавляемую концентрацию NR в пробу, варибельность концентрации может зависеть от таксономической принадлежности видов водорослей и условий их выращивания; б) подбирать определённое время окрашивания [Cooksey et al., 1987; Chen et al., 2009; Huang, Chen, Chen, 2009; Satpati, Pal, 2015]. Основным недостатком использования NR заключается в том, что достоверность окрашивания различается в зависимости от деформации клеток водорослей и сильно зависит от неравномерного поглощения красителя из-за полярности растворителя, используемого для получения конечного раствора флуорохрома [de la Jara et al., 2003; Gao et al., 2008; Chen et al., 2009; Huang, Chen, Chen, 2009]. Всё это хорошо объясняет частое несовпадение данных витального окрашивания и традиционных методов определения липидов и требует дальнейшего и более детального изучения поставленной проблемы.

Цель работы заключалась в выборе оптимальных условий окраски нильским красным различных видов микроводорослей для оценки липидного комплекса, а также сопоставление данного метода с традиционными методами оценки липидов.

Материалы и методы

Моновидовые неаксеничные культуры диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin, 1897) и *Cylindrotheca closterium* (Reimannet et Lewin, 1964), а также зелёной *Dunaliella salina* (Teodoresko, 1905) из коллекции отдела экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей выращивали в колбах объёмом 250 мл при постоянном освещении люминесцентными лампами холодного свечения (Philips TLRS 20W/54765). *Phaeodactylum tricorutum*,

Dunaliella salina выращивали в накопительном режиме, пробы на липиды отбирали в момент выхода водорослей на стационарную фазу роста, которую определяли по скорости прироста численности клеток [Финенко, Ланская, 1971]. Культуру *C. closterium* адаптировали к разработанной нами ранее питательной среде RS [Железнова и др., 2015] на люминистате. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для четырёх вариаций экспериментов. В первых двух экспериментах *C. closterium* выращивали в накопительном и квазинепрерывном режимах культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объёмом 2 л при круглосуточном освещении. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (0,5 л воздуха на 1 л культуры) посредством компрессорной установки. Удельная скорость протока в квазинепрерывном режиме культивирования составляла 0,3 сут⁻¹. При квазинепрерывном режиме культивирования использовали двухступенчатый хемостат. В первом эксперименте на пятые сутки стационарной фазы были отобраны пробы для определения липидов. Во втором эксперименте, при культивировании в квазинепрерывном режиме в двухступенчатом хемостате, культура выходила на стационарную фазу на седьмые — восьмые сутки культивирования, после чего на десятые сутки начинали делать проток с удельной скоростью 0,3 сут⁻¹. После достижения продуктивности постоянной величины (0,5 г · л⁻¹) были отобраны аликвоты с первой и со второй ступеней для определения содержания липидов. Четвёртая проба была отобрана с маточной культуры и находилась в стационарной фазе роста.

Уровень освещения измеряли люксметром Ю-116. Экспериментальные условия приведены в таблице 1. Опыты ставили в трёх повторностях. Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали пробы объёмом 3 мл.

Таблица 1

Условия выращивания культур микроводорослей				
Вид	Т, °С	Освещённость, мкЭ · м ⁻² · с ⁻¹	Продолжительность опыта, сут.	Среда
<i>Ph. triornutum</i>	19	140	21	f/2 [Guillard, Ryther, 1962]
<i>D. salina</i>	21	43	21	f/2
		140	16	f/2
		140	16	[Инструкция по ... , 1986]
		1700	2	f/2
<i>C. closterium</i>	20–21	310	14	RS[Железнова и др., 2015]
			20	RS[Железнова и др., 2015]
			20	RS[Железнова и др., 2015]
			20	5 F

Плотность *C. closterium* определяли двумя методами: методом йодатной окисляемости и прямым взвешиванием сырой массы в полипропиленовых пробирках на аналитических весах с погрешностью 0,1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 г в течение 2 мин) [Оценка плотности ... , 2015]. Для пересчёта полученных данных на сухую массу использовали экспериментальный коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0,1$). Метод прямого взвешивания биомассы *C. closterium* использовали только в стационарной фазе роста. Численность *Ph. triornutum*, *D. salina* определяли на проточном цитометре CytomicsTMFC 500 (BeckmanCoulter, США), оборудованном 488-нм однофазным аргоновым лазером, используя также программное обеспечение СХР.

Общую численность неокрашенных клеток микроводорослей на проточном цитометре определяли согласно протоколу, опубликованному ранее [Соломонова, Муханов, 2011].

Для определения относительного содержания липидов в клетках микроводорослей использовали флуоресцентный краситель нильский красный (NR, максимумы возбуждения и эмиссии 488 и 640 нм соответственно) [Cooksey et al., 1987]. Рабочий раствор красителя готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) (конечная концентрация $0,1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и хранили при $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ в замороженном состоянии (температура плавления DMSO $+18,5 \text{ }^\circ\text{C}$). Окраску суспензии клеток проводили в соответствии с [de la Jara et al., 2003; Chen et al., 2009]: после оттаивания красителя при комнатной температуре его медленно добавляли в интенсивно перемешиваемую пробу в количестве $20 \text{ мкл} \cdot \text{мл}^{-1}$ (для выбора оптимальной концентрации красителя предварительно проводили тестовые окраски с различными вариациями концентраций от 3 до $50 \text{ мкл} \cdot \text{мл}^{-1}$). Окраску производили в темноте в течение 10 мин (для выбора оптимального времени предварительно проводили тестовые окраски от 1 до 20 мин).

Оранжевая флуоресценция (канал FL2, 575 нм) была использована для идентификации липидов в клетках исследуемых видов водорослей с помощью проточного цитометра. На рисунке 1а показана неокрашенная нильским красным культура *Dunaliella salina*, адаптированная к интенсивности света $1700 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, на рисунке 1б — та же культура, окрашенная NR.

Содержание общих липидов исследуемых видов водорослей определяли колориметрическим сульфофосфованилиновым методом в модификации [Руководство по ... , 2004; Wawrik, Harriman, 2010]. Для определения содержания липидов отбирали определённую аликвоту микроводорослей, при этом навеска сырой биомассы для *D. salina* и *Ph. tricorutum* не должна превышать $0,1 \text{ г}$, для *C. closterium* — не должна превышать веса от $0,2$ до $0,3 \text{ г}$. В связи с тем что сырая масса водорослей может содержать до 90% воды, первую экстракцию проводили смесью Фолча в соотношении 1 хлороформ : 1 этанол. Последующие две-три экстракции липидов проводили смесью Фолча в соотношении 2 хлороформ : 1 этанол. Экстракты объединяли и промывали три-четыре раза дистиллированной водой для удаления нелипидных примесей. Затем аликвоту липидного экстракта сжигали в концентрированной серной кислоте. Время сжигания пробы составило 20 мин. После добавления фосфованилинового реактива и развития окраски определяли оптическую плотность проб на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 530 нм по стандартной формуле [Руководство по ... , 2004; Wawrik, Harriman, 2010].

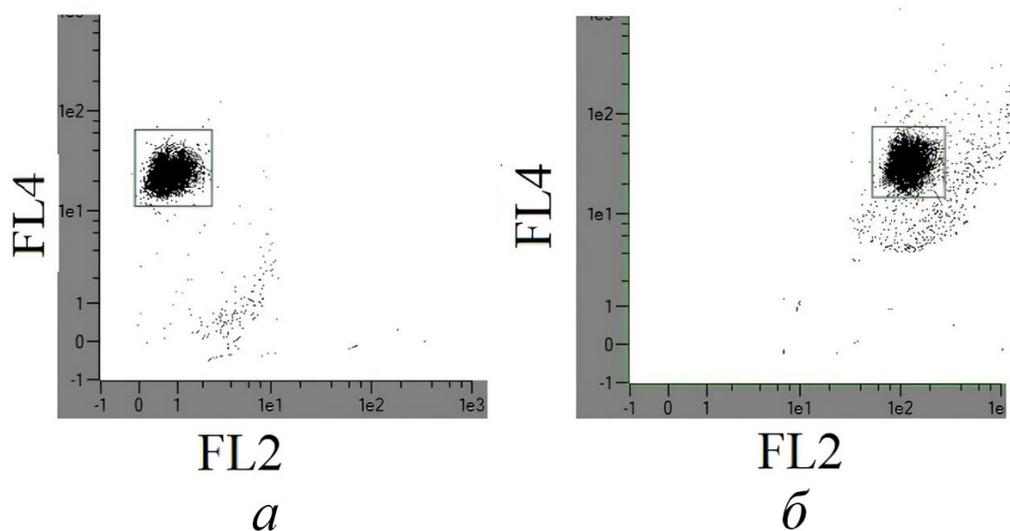


Рис. 1. Цитограммы кластеров культуры *Dunaliella salina* — неокрашенной NR (а) и окрашенной NR (б); ось абсцисс — флуоресценция в красной области спектра (FL4, 675 нм), ось ординат — флуоресценция в оранжевой области спектра (FL2, 575 нм)

В качестве стандарта для построения калибровочного графика использовали липиды, выделенные из *C. closterium* смесью Фолча, данную калибровочную кривую применяли для всех используемых в работе видов микроводорослей (рисунок 2).

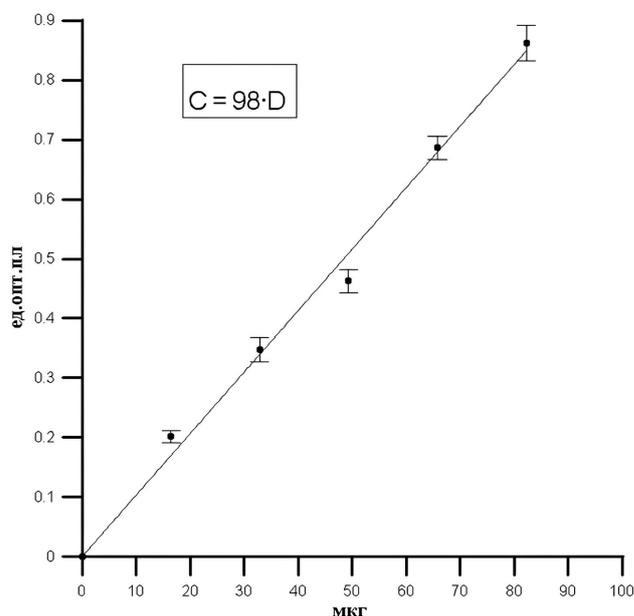


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности на длине волны 530 нм (ось ординат) от концентрации липидов (ось абсцисс)

Статистическая обработка данных выполнялась на базе стандартных программных пакетов Microsoft Excel 7.0, Statistica-5, Grapher-9, SigmaPlot для персонального компьютера. Рассчитывали средние арифметические и стандартные отклонения (SD) (минимум 3000 клеток для каждой из проб) по трём повторностям. Достоверность различий выборочных средних оценивали с помощью парного t-критерия (α) и коэффициентов корреляции (R). Для получения уравнений корреляции использовали линейный регрессионный анализ (P – 95 %).

Результаты и обсуждение

На рисунке 3а показан выбор оптимального времени окрашивания, на рисунке 3б — оптимальной концентрации добавляемого красителя NR в аликвоту с культурой. Такого рода процедура была проведена для всех исследуемых видов водорослей и получен идентичный результат. На предложенном рисунке в качестве примера выбран вид *Dunaliella salina*, выращенный при интенсивности света $140 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ на среде f/2. С увеличением продолжительности окрашивания проб NR интенсивность флуоресценции клеток возрастала (смещение пика вдоль оси абсцисс — на рисунке 3а), а её вариабельность снижалась (более высокий и узкий пик). После 7 мин окрашивания характер флуоресценции водорослей менялся незначительно. При продолжительности окраски более 20 мин флуоресценция FL2 оказывалась завышенной, вероятно, за счёт неспецифических свойств самого красителя.

Оптимальное время окрашивания составляло около 10 мин, поскольку при этом достигалась максимальная интенсивность окраски клеток (пик смещён вправо достаточно далеко, чтобы избежать недооценки окрашенных клеток) и её наименьшая вариабельность (узкий пик). Наши результаты хорошо согласуются с опубликованными протоколами 10-минутной окраски нильским красным разных видов микроводорослей с применением проточной цитометрии и с использованием флуоресцентного спектрофотометра [de la Jara et al., 2003; Chen et al., 2009].

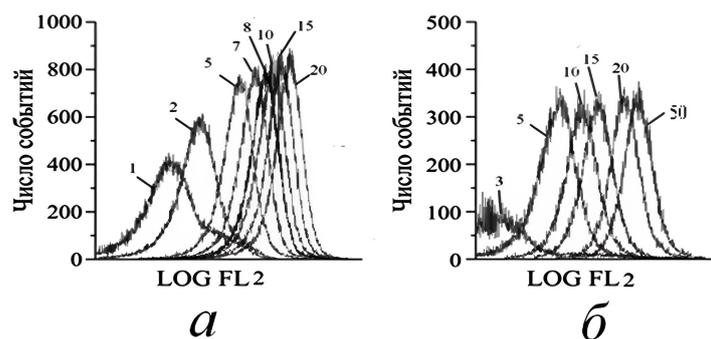


Рис. 3. Зависимость интенсивности и характера окраски нильским красным (флуоресценция FL2 — ось абсцисс) культуры *Dunaliella salina* от её продолжительности (а) (время указано в минутах) и концентрации рабочего раствора NR (мкл) (б)

Оптимальная концентрация рабочего раствора NR составила 20 мкл на 1 мл культуры. Следует отметить, что флуоресценция FL2 при добавлении свыше 25 мкл рабочего раствора возрастала незначительно, что позволило сделать вышеизложенный вывод об оптимальной концентрации NR для исследуемых видов водорослей. Аналогичные результаты были получены для *Navicula sp.* и *Tropidoneis sp.* [Cooksey et al., 1987], тем не менее авторами [Cole et al., 1990] использовались более низкие значения концентрации нильского красного для анализа липидов у инфузорий, а в работе [de la Jara et al., 2003] показано, что оптимальная концентрация NR составила 50 мкл на 1 мл культуры.

Вместе с тем нет полной уверенности в том, что данный метод окраски моновидовых культур окажется столь же эффективным и в цитометрическом исследовании других видов микроводорослей, в частности динофитовых, которые не тестировались в нашем исследовании. Несмотря на то что в ранних исследованиях нильский красный был успешно применён в качестве флуоресцентного зонда для обнаружения как нейтральных, так и полярных липидов у водорослей из различных классов [Cooksey et al., 1987; Eltgroth, Watwood, Wolfe, 2005; Elsey et al., 2007; Mendoza et al., 2008; Chen et al., 2009], для представителей рода Chlorophyceae получены плохо воспроизводимые и случайные результаты [Satpati, Pal, 2015]. Авторы [de la Jara et al., 2003] объясняют это наличием у зелёных микроводорослей толстой, жёсткой стенки клеток, которая препятствует эффективному проникновению красителя. Однако нами показана возможность окраски NR зелёной культуры *Dunaliella salina*, которую тестировали в ряде работ, включая нашу [Mendoza et al., 2008; Guzmán et al., 2012].

Чтобы убедиться, что флуоресцентный метод определения липидов даёт результаты, сходные с традиционным спектрофотометрическим методом, использовали образцы культур микроводорослей различных таксономических групп, выращенные в условиях среды, приведённых в таблице. На рисунке 4 показана достоверная положительная корреляция между содержанием липидов в клетках водорослей и интенсивностью флуоресценции нильского красного (канал FL2).

Наши результаты показали отсутствие существенной разницы между двумя используемыми в работе методами. В работах [Cooksey et al., 1987; de la Jara et al., 2003; Elsey et al., 2007; Mendoza et al., 2008] получена также положительная линейная корреляция, однако с меньшим коэффициентом детерминации, что, вероятно, связано с ошибками при измерении липидов используемым в работах гравиметрическим методом, основные недостатки которого описаны нами во введении. Не стоит исключать и возможные неточности, связанные с флуоресцентным методом, который также может привести к переоценке или недооценке содержания липидов в клетках водорослей, так как интенсивность флуоресценции красителей зависит от характеристик отдельных штаммов, особенно это касается микроводорослей рода Chlorophyceae или других видов и условий окраски.

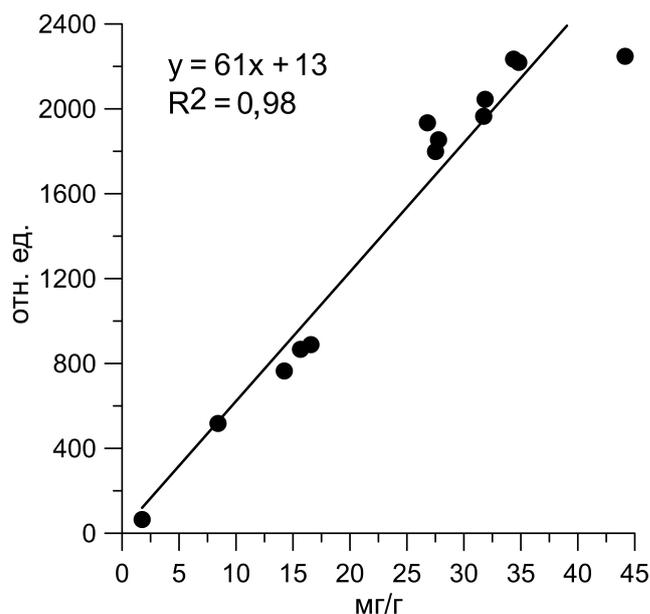


Рис. 4. Зависимость между интенсивностью флуоресценции NR (FL2) (ось абсцисс) и содержанием липидов в клетках водорослей (ось ординат)

Тем не менее результаты, приведенные в данной работе, показали, что комбинирование стандартного спектрофотометрического метода и флуоресцентного, реализуемого путём окрашивания клеток нильским красным, может служить надёжным подходом для оценки липидов в клетках микроводорослей. Полученная высокая достоверная корреляция между двумя методами (относительная стандартная ошибка 3 %) позволяет сделать вывод о перспективности флуоресцентного метода, который даёт возможность избегать использования опасных растворителей и длительных, трудоёмких процедур. Следует также отметить, что такой подход в сочетании с проточной цитометрией позволяет определять липиды даже в низкоконцентрируемой культуре водорослей и сам анализ в среднем занимает тридцать минут.

Таким образом, используемые в экспериментах культуры микроводорослей хорошо окрашивались нильским красным на разных стадиях роста, что позволяло эффективно оценивать относительное содержание липидов в них с помощью проточной цитометрии. Оптимальное время окраски составило 10 минут, концентрация рабочего раствора NR, добавляемого в культуральную среду, — 20 мкл на 1 мл культуры. Результаты показали отсутствие существенной разницы между применёнными в работе методами: традиционным спектрофотометрическим и флуоресцентным ($R^2 = 0,98$).

Выводы

Полученные результаты показали отсутствие существенной разницы между спектрофотометрическим и флуоресцентным методами определения липидов в микроводорослях. Комбинирование стандартного спектрофотометрического метода и флуоресцентного, реализуемого путём окрашивания клеток нильским красным, может служить надёжным подходом для оценки липидов в клетках микроводорослей.

Список литературы

1. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г., Бобко Н. И., Лелеков А. С. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – перспективного объекта биотехнологий // Актуальная биотехнология. – 2015. – № 3. – С. 46–48.
2. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости / Геворгиз Р. Г. [и др.] ; Рос. акад. наук, Ин-т мор. биол. исслед. им. А. О. Ковалевского. – Севастополь : ИМБИ, 2015. – 31 с.
3. Инструкция по массовому разведению морских одноклеточных водорослей и коловраток / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии ; сост.: Л. В. Спекторова [и др.]. – Москва : ВНИРО, 1986. – 63 с.
4. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / Всесоюз. науч.-исслед. ин-т мор. рыб. хоз-ва и океанографии ; под ред. А. И. Агатовой. – Москва : ВНИРО, 2004. – 123 с.
5. Соломонова Е. С., Муханов В. С. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornerutum* и *Nitzschia sp* с помощью проточной цитометрии // Морской экологический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 67–72.
6. Финенко З. З., Ланская Л. А. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды // Экологическая физиология морских планктонных водорослей (в условиях культур) / Акад. наук УССР, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского ; под общ. ред. К. М. Хайлова. – Киев : Наук. думка, 1971. – С. 22–51.
7. Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol. 37, nr 8. – P. 911–917. – <https://doi.org/10.1139/O59-099>
8. Brett M., Müller-Navarra D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes // Freshwater Biology. – 1997. – Vol. 38, iss. 3. – P. 483–499. – <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00220.x>
9. Chen W., Zhang C., Song L., Sommerfeld M., Hu Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae // Journal of Microbiological Methods. – 2009. – Vol. 77, iss. 1. – P. 41–47. – <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>
10. Cole T. A., Fok A. K., Ueno M. S., Allen R. D. Use of Nile red as a rapid measure of lipid content in ciliates // European Journal of Protistology. – 1990. – Vol. 25, iss. 4. – P. 361–368. – [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80129-X](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80129-X)
11. Cooksey K. E., Guckert J. B., Williams S. A., Callis P. R. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red // Journal of Microbiological Methods. – 1987. – Vol. 6, iss. 6. – P. 333–345. – [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90019-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90019-4)
12. Davey H. M., Kell D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses // Microbiological Reviews. – 1996. – Vol. 60, iss. 4. – P. 641–696. – <https://doi.org/10.1128/mr.60.4.641-696.1996>
13. Eelsey D., Jameson D., Raleigh B., Cooney M. J. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – Vol. 68, iss. 3. – P. 639–642. – <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.008>
14. Eltgroth M. L., Watwood R. L., Wolfe G. V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the Haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi* // Journal of Phycology. – 2005. – Vol. 41, iss. 5. – P. 1000–1009. – <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00128.x>

15. Gao C., Xiong W., Zhang Y., Yuan W., Wu Q. Rapid quantitation of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance // Journal of Microbiological Methods. – 2008. – Vol. 75, iss. 3. – P. 437–440. – <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.019>
16. Guillard R. R. L., Ryther J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Canadian Journal of Microbiology. – 1962. – Vol. 8, nr 2. – P. 229–239. – <https://doi.org/10.1139/m62-029>
17. Guzmán H. M., de la Jara Valido A., Presmanes K. F., Duarte L. C. Quick estimation of intraspecific variation of fatty acid composition in *Dunaliella salina* using flow cytometry and Nile Red // Journal of Applied Phycology. – 2012. – Vol. 24, iss. 5. – P. 1237–1243. – <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9768-y>
18. Gurr M. I., Harwood J. L., Frayn K. N. Lipid Biochemistry. – 5th ed. – Oxford : Blackwell Science, 2002. – 336 p.
19. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. Microalgal Triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances // The Plant Journal. – 2008. – Vol. 54, iss. 4. – P. 621–639. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
20. Huang G. H., Chen G., Chen F. Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile Red fluorescence // Biomass and Bioenergy. – 2009. – Vol. 33, iss. 10. – P. 1386–1392. – <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.05.022>
21. de la Jara A., Mendoza H., Martel A., Molina C., Nordström L., de la Rosa V., Díaz R. Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii* // Journal of Applied Phycology. – 2003. – Vol. 15, iss. 5. – P. 433–438. – <https://doi.org/10.1023/A:1026007902078>
22. Mendoza H., de la Jara A., Freijanes K., Carmona L., Ramos A. A., de Sousa Duarte V., Varela J. C. S. Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains // Electronic Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 11, iss. 4. – P. 2–13. – <https://doi.org/10.2225/vol11-issue4-fulltext-2>
23. Montero M. F., Aristizábal M., Reina G. G. Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting // Journal of Applied Phycology. – 2011. – Vol. 23, iss. 6. – P. 1053–1057. – <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9623-6>
24. Pereira H., Barreira L., Figueiredo F., Custódio L., Vizetto-Duarte C., Polo C., Rešek E., Engelen A., Varela J. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications // Marine Drugs. – 2012. – Vol. 10, iss. 9. – P. 1920–1935. – <https://doi.org/10.3390/md10091920>
25. 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 // Annals of Microbiology. – 2015. – Vol. 65, no 2. – P. 937–949. – <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0937-5>
26. Shahidi F., Ambigaipalan P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits // Annual Review of Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 9. – P. 345–381. – <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
27. Wawrik B., Harriman B. H. Rapid, colorimetric quantification of lipid from algal cultures // Journal of Microbiological Methods. – 2010. – Vol. 80, iss. 3. – P. 262–266. – <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.016>

**INVESTIGATION OF THE BIOCHEMICAL CONTENT OF MICROALGAE
USING FLOW CYTOMETRY**

Solomonova E. S., Zheleznova S. N.

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,
e-mail: solomonov83@mail.ru*

Abstract: Lipid content in microalgae cells belonging to different taxonomic groups and grown under different cultivation conditions was determined using spectrophotometric and flow cytometry methods in combination with fluorochrome Nile Red (NR), a fluorescent marker of neutral and polar lipids in algal cells. It was shown that all cultures used in the experiments stained well with Nile Red at different growth stages: orange fluorescence of FL2 channel (575 nm), was marked for lipid identification in the cells. The optimum staining time was 10 min, when NR working solution was added, 20 μ l per 1 ml of culture medium. The results obtained showed that there was no significant difference between spectrophotometric and fluorescence methods for the determination of lipids in microalgae, $R^2 = 0.98$. Combination of standard spectrophotometric method and fluorescence method realized by staining cells with Nile Red can serve as a reliable approach for estimation of lipids in microalgae cells.

Keywords: lipids, microalgae, spectrophotometric method, flow cytometry, Nile Red.

Сведения об авторах

Соломонова
Екатерина
Сергеевна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, e-mail: solomonov83@mail.ru

Железнова
Светлана
Николаевна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, e-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

*Поступила в редакцию 26.12.2023 г.
Принята к публикации 12.01.2024 г.*