

УДК 582.232:57.084.1

**ОСОБЕННОСТИ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ПРОБОПОДГОТОВКИ
КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*
ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ АССОЦИИРОВАННОЙ С НЕЙ МИКРОФЛОРЫ
МЕТОДАМИ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ
И СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ**

© 2024 г. **О. А. Рылькова, И. А. Харчук, А. С. Лелеков, В. Н. Лишаев, Я. Д. Жондарева**

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: ol.rylkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.12.2023; после доработки 03.05.2024;
принята к публикации 10.09.2024; опубликована онлайн 19.11.2024.

Контроль количественных характеристик ассоциированной с альгокультурами микрофлоры важен в биотехнологических исследованиях. С целью более полного выявления и детального анализа сопутствующей микрофлоры в культуре *Arthrospira (Spirulina) platensis* использованы методы физико-химической пробоподготовки образцов для последующего изучения суспензии с помощью проточной цитометрии после окраски клеток флуорохромом SYBR Green I и сканирующей электронной микроскопии. Показано, что оптимальными вариантами пробоподготовки являлись применение химического реагента (пирофосфата натрия или метанола), перемешивание суспензии, ультразвуковая обработка, центрифугирование и дополнительные промывочные процедуры. При этом из культуры цианобактерий изначально извлекалось в среднем $(27,1 \pm 3,9) \%$ «потенциальной» кумулятивной численности бактерий. При последующих трёх промывках количество микроорганизмов достоверно увеличивалось в среднем до $(88,9 \pm 6,3) \%$ (парный *t*-тест; $p < 0,05$). Далее в осадке количество микроорганизмов оставалось незначительным, 6–11 %, и этим можно было пренебречь. Показано, что численность бактерий на различных этапах культивирования *A. platensis* изменялась от $6,7 \times 10^6$ до $1,7 \times 10^8$ кл.·мл⁻¹. В морфологической структуре ассоциированной микрофлоры (на стационарной стадии роста *A. platensis*) доминировали крупные палочковидные клетки (67,2 %), доля извитых форм была почти вдвое ниже (30,2 %), ещё реже встречались округлые формы (2,6 %). Средний объём бактериальной клетки составлял $(0,16 \pm 0,02)$ мкм³, биомасса — 0,022–0,025 г·л⁻¹. Полученные величины показателей сопутствующей микрофлоры сопоставимы с данными, приведёнными в литературе для *A. platensis* и других альгокультур. Предложенные методы обработки суспензии *A. platensis* существенно повышали эффективность высвобождения бактерий, способствовали очищению пробы от фрагментов трихом цианобактерий, детрита и прочих частиц и обеспечивали возможность исследования ассоциированной микрофлоры с использованием проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии.

Ключевые слова: цианобактерии, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, ассоциированная микрофлора, бактерии, микроорганизмы, численность бактерий, биомасса бактерий, методы пробоподготовки, десорбция клеток, физико-химическая обработка, ультразвуковая обработка, люминесцентная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, проточная цитометрия

В экспериментальных установках и в открытых бассейнах при выращивании альгокультур всегда есть сопутствующая микрофлора. Микроорганизмы могут влиять на жизнеспособность и биохимические показатели микроводорослей и цианобактерий [Борисова, 1996; Кублановская, 2019; Тархова, 2005]. Взаимоотношения гетеротрофных микроорганизмов с альгокультурой разнообразны — от угнетения до стимулирования роста бактерий водорослями/цианобактериями и наоборот [Игнатенко, Немцева, 2012; Кублановская, 2019; Ashen, Goff, 2000; Ramanan et al., 2015; Sapp et al., 2007; Seymour et al., 2017]. Контроль количественных характеристик ассоциированной микрофлоры является важным моментом в биотехнологических исследованиях, так как получаемая биомасса в дальнейшем может быть использована для производства биологически активных веществ, пищевых добавок и пр. [Каленик и др., 2019; Falquet, Hurni, 2006; Jung et al., 2022].

Известно, что проточная цитометрия, а также сканирующая электронная и люминесцентная микроскопия успешно применяются в альгологических и микробиологических исследованиях. Для большинства автотрофных микроводорослей размером менее 30 мкм (*Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Platymonas viridis*, *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis viridis*, *Thalassiosira weissflogii* и др.) непосредственно в культуральной суспензии без какой-либо пробоподготовки с помощью проточной цитометрии проводят анализ различных параметров (численность, гранулярность, интенсивность флуоресценции пигментов и пр.) [Пауэн и др., 2011; Solomonova et al., 2024 и др.]. В тех же подпробах после окраски флуорохромами возможно исследование сопутствующей гетеротрофной микрофлоры [Пауэн и др., 2011; Danger et al., 2007].

С учётом того, что трихомы *Arthrospira (Spirulina) platensis* достигают длины 50–300 мкм, использование проточной цитометрии для изучения нативной суспензии цианобактерий невозможно. Однако при условии предварительной пробоподготовки образцов, целью которой является отделение клеток бактерий от трихом *A. platensis* или частиц небиологической природы, проведение цитометрических или электронно-микроскопических исследований сопутствующей микрофлоры вполне допустимо [Kharchuk et al., 2022].

Известно, что при изучении бактерий из образцов почв, донных отложений и слоевищ макрофитов проводят предварительную физико-химическую обработку проб [Звягинцев, 1970; Пуговкин, 2016; Danovaro et al., 2001; Kallmeyer et al., 2008; Lunau et al., 2005]. Такой методический подход обеспечивает десорбцию и отделение клеток микроорганизмов от частиц различной природы, сильно затрудняющих распознавание бактериальных клеток при любом способе их регистрации [Danovaro et al., 2001; Kallmeyer et al., 2008; Morono et al., 2009; Weinbauer et al., 1998].

Наиболее часто в качестве химического реагента используют различные поверхностно-активные вещества — неионные (Tween 80) и ионные (пирофосфат натрия) [Danovaro et al., 2001; Danovaro, Middelboe, 2010; Frischer, Danforth, 2000]. Известно о применении метанола, который разрушает полисахаридные экзополимеры, удерживающие клетки микроорганизмов на органических или неорганических частицах [Kallmeyer et al., 2008; Lunau et al., 2005]. В дополнение к химической обработке проб предложена последующая механическая — перемешивание, использование ультразвука, центрифугирование [Kallmeyer et al., 2008; Lindahl, Bakken, 1995]. Указано, что данный подход позволяет, например, на несколько порядков увеличить значения численности регистрируемых бактерий в морских осадках, а также определить количество бактерий-эпифитов на слоевищах *Macrocystis integrifolia*, хотя стандартными методами этого сделать не удалось [Velji, Albright, 1986]. При этом необходимо правильно подобрать режим обработки, чтобы максимально извлечь микроорганизмы из образца, не разрушить их и не снизить численность бактерий при их последующем количественном учёте [Пуговкин, 2016]. В литературе нами не обнаружены данные о применении подобного методического подхода при исследовании микрофлоры, ассоциированной с культурой *A. platensis*.

Именно поэтому целью настоящего исследования было проанализировать известные методы физико-химической пробоподготовки для эффективной десорбции и последующего высвобождения клеток бактерий и апробировать их при изучении суспензии *Arthrospira platensis*, а также определить количественные показатели и морфологические характеристики ассоциированной с культурой цианобактерий микрофлоры методами проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Объектом исследования служила альгологически чистая неаксеничная культура *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont (штамм IBSS-31) из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ [накопительное культивирование, температура +20...+21 °С, непрерывное освещение, интенсивность света на поверхности культуральной среды 5 клк (люксметр Ю-116, Россия)].

На первом этапе (отработка методики предварительной пробоподготовки суспензии цианобактерий для цитометрических и микроскопических исследований) пробы отбирали из коллекционной культуры *A. platensis* ежедневно в течение недели.

На втором этапе работ исследовали численность сопутствующей микрофлоры на различных стадиях культивирования *A. platensis*. На стационарной фазе роста цианобактерий детально изучили морфологическую структуру ассоциата — определили линейные размеры бактерий и рассчитали их биомассу.

Для снижения изначального бактериального загрязнения при подготовке *A. platensis* к эксперименту и далее использовали стерильную посуду, а также стерильные расходные материалы и растворы (среда Заррука для культивирования цианобактерий [Faucher et al., 1979], дистиллированная вода для промывки). Трихомы *A. platensis* (пасту) концентрировали путём фильтрации через мельничный газ 100–105 ПЭ, затем трижды промывали дистиллированной водой (в соотношении 1 : 3) и дважды — питательной средой. Для максимального удаления ассоциированной микрофлоры, оседающей на слизистых чехлах цианобактерий, пасту *A. platensis* помещали в пробирки с питательной средой и центрифугировали 5 мин при 3000 об·мин⁻¹ (центрифуга ОПн-3 УХЛ 42, Россия), супернатант удаляли, к осадку вновь добавляли питательный раствор; процедуру повторяли трижды.

Очищенную таким образом пасту *A. platensis* (2 мл) переносили в стеклянные колбы (объём 0,5 дм³, объём среды 0,3 дм³, высота слоя 5 см) и выращивали накопительным способом при температуре +20...+25 °С на люминистате (непрерывное освещение, интенсивность света на поверхности культуральной среды 10 клк). Оптическую плотность цианобактерий контролировали ежедневно; пробы для оценки ассоциированной микрофлоры отбирали раз в неделю, охватывая все стадии роста культуры *A. platensis*. Длительность эксперимента составляла 35 сут.

Подготовка суспензии *Arthrospira platensis* для микроскопических и цитометрических исследований. При анализе сопутствующей микрофлоры все реактивы фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм. В качестве посуды использовали стерильные пробирки объёмом 2 и 15 мл. Аликвоту суспензии *A. platensis* (5–10 мл) фиксировали глутаральдегидом до конечной концентрации 2,5 % и хранили в холодильнике при +4 °С не более двух недель.

Подготовка суспензии *Arthrospira platensis* без химической обработки. Для отделения бактерий от трихом *A. platensis* 2 мл фиксированной суспензии тщательно перемешивали и центрифугировали (Microspin FV-2400, Biosan, Латвия) 5 мин при 3000 об·мин⁻¹; в супернатанте определяли начальную общую численность бактерий (старт) с помощью проточной цитометрии, предварительно окрасив пробу флуорохромом SYBR Green I (см. ниже). Далее проводили серию промывок всего объёма осадка (см. ниже).

Обработка суспензии *Arthrospira platensis* пирофосфатом натрия ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). В пробирку с фиксированной *A. platensis* добавляли 50 мМ раствор пирофосфата натрия до конечной концентрации в пробе 5 мМ и инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре [Danovaro et al., 2001; Danovaro, Middelboe, 2010]. После инкубации для более полной десорбции и отделения бактерий от небиологической фракции и от трихом *A. platensis* все образцы перемешивали с помощью вортекса (Microspin FV-2400) 10–15 с, затем обрабатывали 15 мин при 0 °С на ультразвуковой установке (Unitra Unima 01SZTYN UM-4, VA140, V220, 50 Hz). Для окончательного высвобождения бактерий из осадка пробы центрифугировали (5 мин при 3000 об·мин⁻¹); в супернатанте определяли начальную общую численность бактерий (старт) с помощью проточной цитометрии, предварительно окрасив пробу флуорохромом SYBR Green I. Остатки супернатанта сливали, для всего осадка выполняли серию промывок 3–10 раз (см. ниже).

Обработка суспензии *Arthrospira platensis* метанолом (CH_3OH). В пробирку с фиксированной *A. platensis* добавляли метанол до конечной концентрации в пробе 10 % и перемешивали с помощью вортекса 10–15 с. Затем образцы выдерживали в ультразвуковой установке в течение 15 мин при +35 °С, вновь перемешивали и центрифугировали (5 мин при 3000 об·мин⁻¹) [Kallmeyer et al., 2008; Lunau et al., 2005]. Как и при обработке образца пирофосфатом натрия, аликвоту супернатанта (старт) окрашивали флуорохромом и исследовали с помощью проточного цитометра, для осадка выполняли серию промывок (см. ниже).

Серия промывочных процедур (аналогична для проб без химической обработки и при экспозиции с пирофосфатом натрия или метанолом). Для более полного высвобождения оставшихся микроорганизмов ко всему объёму осадка [после отбора аликвоты для начального определения численности (старт)] добавляли 1 мл стерильной среды Заррука, ресуспендировали с помощью вортекса и вновь центрифугировали 5 мин при 3000 об·мин⁻¹. Аликвоту супернатанта окрашивали флуорохромом SYBR Green I, в ней определяли численность бактерий с помощью проточного цитометра (методологию окраски флуорохромом и цитометрических измерений см. далее). Процедуру промывок повторяли 3–10 раз.

Цитометрические исследования. Окраску бактерий флуорохромом SYBR Green I (×1000, Maclin, Китай) проводили в соответствии с протоколами [Marie et al., 1997; Noble, Fuhrman, 1998]. Раствор флуорохрома готовили из расчёта 10 мкл исходного раствора на 1 мл стерильной Milli-Q воды и хранили при –20 °С. Образцы прокрашивали добавлением 10 мкл этого раствора на 1 мл пробы с последующей инкубацией в темноте в течение 40 мин непосредственно перед измерениями. Анализ проб выполняли на проточном цитометре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия), оборудованном тремя лазерами (405, 488 и 635 нм), в НОЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ. Численность бактерий определяли с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (forward scatter, FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Для обработки данных использовали программу FCS Express 7 Research Edition.

Расчёт численности бактерий. При определении общей численности бактерий учитывали объёмы растворов — фиксатора и вводимых реактивов. Численности микроорганизмов на старте и после промывочных серий суммировали. По полученным данным строили кумулятивные кривые; за 100 % десорбированных из суспензии *A. platensis* клеток принимали результаты, зарегистрированные после 10 промывок.

Микроскопические исследования. Для подготовки препаратов были апробированы различные варианты: только перемешивание и центрифугирование суспензии *A. platensis* (при отсутствии химических реагентов); обработка суспензии пирофосфатом натрия или метанолом с последующей комплексной механической обработкой (перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование).

Для люминесцентной микроскопии (далее — ЛМ) 0,5–1 мл надосадочной жидкости *A. platensis* помещали в фильтровальную установку и окрашивали флуорохромом DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, Servicebio, Китай). Концентрация рабочего раствора флуорохрома составляла $2 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$; в пробу добавляли 50 мкл красителя на 1 мл супернатанта, окрашивали 2 мин в темноте [Hoff, 1988]. После окраски пробу концентрировали на поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (производство Объединённого института ядерных исследований, Дубна, Россия), разрежение в процессе фильтрации не превышало 0,2 атм. Для снижения автофлуоресценции фильтры предварительно окрашивали в течение суток иргаланом чёрным (2 г в 0,2%-ной уксусной кислоте) [Hobbie et al., 1977]. Исследования проводили под микроскопом Olympus CX43 (Япония), увеличение $\times 1000$, при возбуждении в ультрафиолетовой области спектра (358 нм) и эмиссии в синей (461 нм).

При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа 0,5–1 мл супернатанта *A. platensis* концентрировали на поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (производство Объединённого института ядерных исследований). Далее проводили дегидратацию образцов, используя серию разведений этанола: 20, 30, 50, 75, 96 и 100 % [Bratbak, 1993]. Для сушки образцов в критической точке (1,5–2,5 ч) применяли устройство Leica EM CPD300 (Германия), для напыления (Au/Pd, 0,5–1,0 мин) — Leica EM ACE200 (Германия). Образцы просматривали под сканирующим электронным микроскопом Hitachi SU3500 (Япония) при увеличении $\times 4000$.

Морфологические исследования. Определение размеров клеток и расчёт биомассы бактерий. Размеры бактерий [по данным сканирующей электронной микроскопии (далее — СЭМ)] определяли с помощью программы ImageJ 1.50i [Национальные институты здравоохранения США, Java 1.6.0_20 (32-bit)]. Всего измерено 475 клеток, определены линейные размеры, рассчитан вклад каждой из морфологических групп бактерий в численность. Объём кокков устанавливали по формуле объёма шара ($V_{\text{ш}} = 1 / 6\pi d^3$), где d — диаметр кокков. Объём палочек и извитых форм определяли по формуле объёма цилиндра ($V_{\text{ц}} = 1 / 4\pi d^2 h$), где d — ширина; h — длина [Потапова, Королевская, 1991; Романенко, Добрынин, 1973]. При расчёте объёма бактериальных клеток вводили поправочный коэффициент их «усушки» 1,6 [Потапова, Королевская, 1991; Сажин и др., 1987]. Содержание углерода в бактериальных клетках принимали за 11 % от сырой биомассы [Троицкий, Сорокин, 1967].

Биомассу рассчитывали:

а) с учётом численности бактерий (по данным проточной цитометрии) и среднего объёма клеток (по данным СЭМ);

б) с учётом численности бактерий (по данным проточной цитометрии) и коэффициента $2,0 \times 10^{-14} \text{ г С} \cdot \text{кл.}^{-1}$ [Lee, Furman, 1987].

Статистический анализ проводили в пакете Statistica (Data Analysis Software System), версия 10 (StatSoft, Inc., <https://www.statsoft.com/>). Графики строили в программах SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.), Grapher 8 (Golden Software, Inc., <https://www.goldensoftware.com/>) и Surfer 11 (Golden Software, Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выяснения эффективности отделения бактерий от частиц детрита и клеток цианобактерий была проведена серия предварительных экспериментов:

- без химической обработки (только центрифугирование и перемешивание суспензии *A. platensis*);
- с обработкой суспензии химическим реагентом (пирофосфат натрия или метанол) и последующей комплексной механической обработкой, включающей перемешивание, ультразвуковую обработку и центрифугирование.

В каждом случае дополнительно проводили серию из 10 промывочных процедур. Численность бактерий регистрировали с помощью проточной цитометрии, предварительно окрасив пробы флуорохромом SYBR Green I.

В результате проведённых исследований оказалось: как без химической обработки, так и при использовании пирофосфата натрия или метанола первично из культуральной суспензии (старт) вымывалось от 14,8 до 45,9 % бактериальных клеток [в среднем $(27,1 \pm 9,0) \%$]. После серии из 3 промывок количество микроорганизмов достоверно (парный t -тест; $p < 0,05$) увеличивалось до 82,0–94,3 % [в среднем $(88,9 \pm 6,3) \%$] (рис. 1А–В).

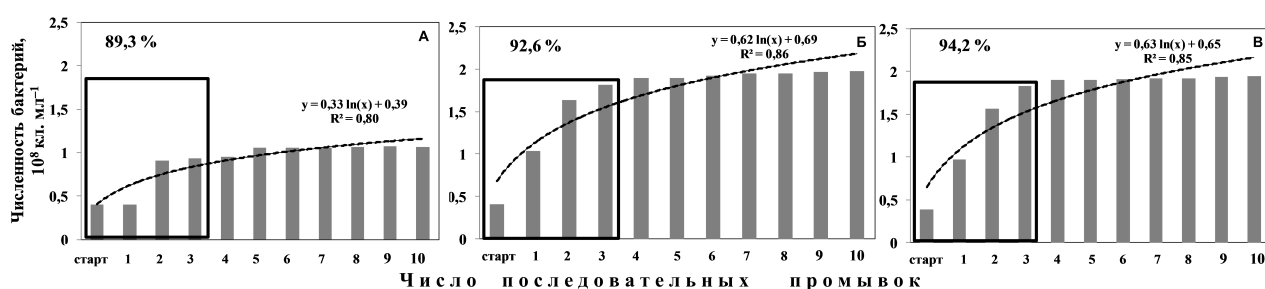


Рис. 1. Начальная численность бактерий (старт) и численность после промывок (1–10) в суспензии *Arthrospira platensis* после окраски SYBR Green I и подсчёта клеток с помощью проточной цитометрии (стационарная стадия роста коллекционной культуры *A. platensis*, накопительное культивирование): А — без химической обработки (только перемешивание и центрифугирование); Б — после обработки метанолом, перемешивания, ультразвуковой обработки и центрифугирования; В — после обработки пирофосфатом натрия, перемешивания, ультразвуковой обработки и центрифугирования

Fig. 1. Initial bacterial abundance (старт) and abundance after washes (1–10) in *Arthrospira platensis* suspension after staining with SYBR Green I and cell counting by flow cytometry (*A. platensis* collection culture at the stationary phase, batch cultivation): А, without chemical treatment (stirring and centrifugation only); Б, after exposure to methanol, stirring, ultrasonic treatment, and centrifugation; В, after exposure to sodium pyrophosphate, stirring, ultrasonic treatment, and centrifugation

При увеличении количества промывок до 4–10 бактерии продолжали вымываться из осадка, однако разница между «потенциальной» кумулятивной численностью клеток в последующих промывках была недостоверной (парный t -тест; $p > 0,05$). Так, без применения химического реагента (только перемешивание и центрифугирование) из суспензии *A. platensis* извлекалось ещё 11 % сопутствующих бактерий. При использовании пирофосфата натрия или метанола и при последующей комплексной механической обработке (перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование) вымывалось дополнительно 6–7 % микроорганизмов. Конечно, даже после 10 промывочных процедур не все бактерии вымывались из осадка, некоторые из них оставались связанными с частицами, однако их количество было незначительным и достаточно постоянным, так что этим можно было пренебречь.

В целом в этой предварительной серии экспериментов общая численность бактерий в суспензии *A. platensis* без химической обработки (только центрифугирование) составила в среднем $(1,24 \pm 0,21) \times 10^8$ кл.·мл⁻¹; при использовании пирофосфата натрия или метанола, ультразвуковой обработке и центрифугировании она увеличилась до $(2,10 \pm 0,50) \times 10^8$ кл.·мл⁻¹. Таким образом, в случае предварительной физико-химической подготовки пробы эффективность высвобождения клеток была в среднем в 1,8 раза выше. В дальнейшем (второй этап работ) мы использовали протокол, включающий экспозицию с химическим реагентом (метанолом), перемешивание, ультразвуковую обработку и центрифугирование.

На втором этапе исследования была проведена апробация физико-химической обработки (использование метанола, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование) культуры *A. platensis* на различных стадиях её роста при определении количества сопутствующей микрофлоры с помощью проточной цитометрии. Численность ассоциированных бактерий в начале эксперимента составляла $6,7 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹; по мере роста культуры *A. platensis* количество бактерий постепенно увеличивалось в 18–25 раз, до значений от $1,5 \times 10^8$ до $2,2 \times 10^8$ кл.·мл⁻¹, в среднем составляя $(0,9 \pm 0,6) \times 10^8$ кл.·мл⁻¹ (рис. 2).

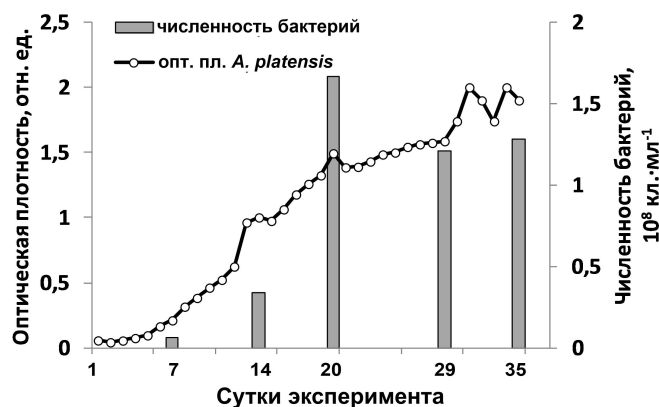


Рис. 2. Численность сопутствующей микрофлоры на различных этапах культивирования *Arthrospira platensis* после предварительной физико-химической обработки суспензии (добавление метанола, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование), окраски SYBR Green I и подсчёта клеток с помощью проточной цитометрии

Fig. 2. Abundance of associated microflora at different stages of *Arthrospira platensis* cultivation after preliminary physical and chemical treatment of suspension (exposure to methanol, stirring, ultrasonic treatment, and centrifugation) followed by staining with SYBR Green I and cell counting by flow cytometry

Контроль цитометрических измерений проводили с помощью микроскопических исследований, которые преследовали две цели. Так, при использовании ЛМ мы проконтролировали, что в супернатанте (после пробоподготовки) содержались бактерии и именно они попадали в капилляр цитометра. Благодаря СЭМ была детализирована морфоструктура бактериального ассоциата. Нами показано, что при отсутствии химической обработки суспензии цианобактерий (в случае использования только центрифугирования) на микроскопические препараты часто попадали фрагменты трихом *A. platensis*. Это усложняло визуализацию клеток бактерий (в случае СЭМ) и делало крайне затруднительным просмотр препарата (в случае ЛМ) из-за сильной автофлуоресценции цианобактерий и быстрого «выгорания» поля зрения.

Наиболее «чистыми» от трихом цианобактерий были препараты, прошедшие предварительную комплексную пробоподготовку — экспозицию с метанолом, перемешивание, ультразвуковую обработку и центрифугирование. На рис. 3А отчётливо видно, что в микрофлоре из суспензии *A. platensis* на стационарной стадии роста культуры преобладали палочки. С помощью СЭМ была детально исследована морфологическая структура сопутствующей микрофлоры и подтверждено доминирование палочковидных, наличие извитых и округлых форм [Лабораторный практикум, 2020; Шлегель, 1987] (рис. 3Б).

В сопутствующем микробиальном сообществе на стационарной стадии роста культуры *A. platensis* доминировали крупные палочковидные клетки (67,2 % от общего числа просчитанных клеток) объёмом $(0,12 \pm 0,01)$ мкм³. Длина клеток изменялась от 0,46 до 7,18 мкм, ширина варьировала от 0,11 до 0,94 мкм. Вклад извитых форм (спириллы и вибрионы) объёмом $(0,07 \pm 0,01)$ мкм³, длиной 0,11–11,04 мкм и шириной 0,05–0,33 мкм составлял 30,2 %.

Ещё реже (в 2,6 % случаев) встречались округлые формы диаметром 0,19–0,55 мкм и объёмом $(0,03 \pm 0,01)$ мкм³ (табл. 1, рис. 3А, Б). В среднем объём бактериальной клетки, рассчитанный по промерам 475 клеток, составлял $(0,10 \pm 0,01)$ мкм³, изменяясь от 0,001 до 1,03 мкм³.

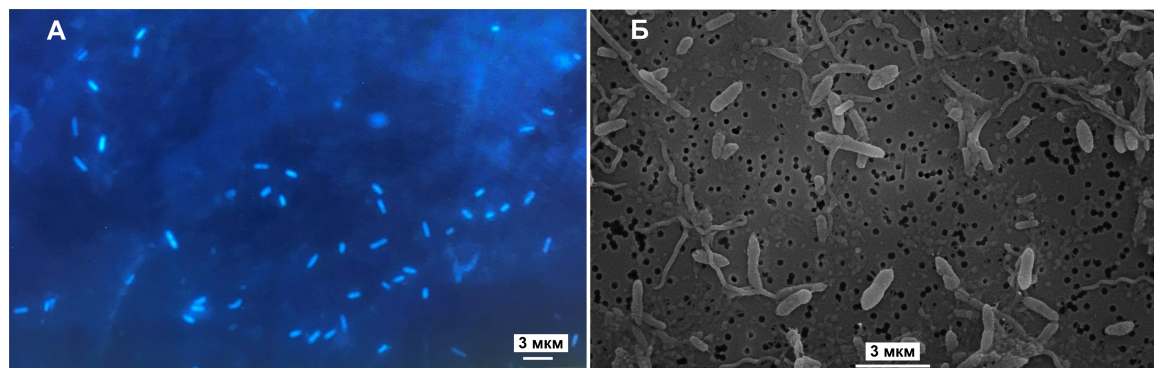


Рис. 3. Микрофлора, сопутствующая культуре *Arthrospira platensis* (стационарная стадия роста, накопительное культивирование) после физико-химической обработки (экспозиция с метанолом, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование): А — по данным люминесцентной микроскопии после окраски флуорохромом DAPI; Б — по данным сканирующей электронной микроскопии

Fig. 3. Microflora associated with *Arthrospira platensis* culture (stationary phase, batch cultivation) after physical and chemical treatment (exposure to methanol, stirring, ultrasonic treatment, and centrifugation): А, according to fluorescence microscopy data after staining with DAPI fluorochrome; Б, according to scanning electron microscopy data

Таблица 1. Морфологические показатели микрофлоры, ассоциированной с культурой *Arthrospira platensis* (стационарная стадия роста, накопительное культивирование) по данным сканирующей электронной микроскопии

Table 1. Morphological parameters of microflora associated with *Arthrospira platensis* culture (stationary phase, batch cultivation) according to scanning electron microscopy data

Морфотип	% встречаемости	Размеры, мкм		Объём, мкм ³
		длина/диаметр	ширина	
Палочки	67,2	$1,35 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
		0,46–7,18	0,11–0,94	0,04–1,03
Извитые формы	30,2	$4,76 \pm 0,39$	$0,13 \pm 0,009$	$0,07 \pm 0,01$
		0,11–11,04	0,05–0,33	0,004–0,35
Кокки	2,6	$0,36 \pm 0,05$	–	$0,03 \pm 0,01$
		0,19–0,55		0,0004–0,09

Примечание: над чертой — среднее значение \pm стандартное отклонение; под чертой — диапазон (min–max).

Note: above the line, mean \pm standard deviation; under the line, range (min–max).

Учитывая, что пробоподготовка для СЭМ являлась достаточно «жёсткой» (обработка фиксатором, дегидратация в этаноле, сушка в критической точке, напыление), мы, как отмечено выше, использовали поправочный коэффициент «усушки» клеток 1,6 [Потапова, Королевская, 1991; Сажин и др., 1987]. Таким образом, полученный нами средний объём бактериальной клетки в культуре цианобактерий, $(0,10 \pm 0,009)$ мкм³, был скорректирован до $(0,16 \pm 0,02)$ мкм³. С учётом содержания углерода в бактериальных клетках (11 % от сырой биомассы) [Троицкий, Сорокин, 1967] и средней численности бактерий, установленной по данным проточной цитометрии $[(1,39 \pm 0,28) \times 10^8$ кл.·мл⁻¹], биомасса микрофлоры, сопутствующей культуре *A. platensis*, составляла 0,022 г·л⁻¹. Кроме того, расчёт биомассы был проведён с использованием коэффициента $2,0 \times 10^{-14}$ г·С·кл.⁻¹ [Lee, Furman, 1987] и той же численности бактерий, и биомасса ассоциированных с культурой *A. platensis* бактерий составила 0,025 г·л⁻¹.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно материалам различных руководств по выращиванию *A. platensis*, в неаксеничных культурах обычно содержится от 3×10^4 до $1,6 \times 10^6$ кл.·мл⁻¹ (табл. 2) [Тархова, 2005; Хадад и др., 1990; Falquet, Hurni, 2006; Wu, Pond, 1981]. Однако указанные исследования были выполнены классическими микробиологическими методами посевов бактерий на питательные среды, а известно, что не все бактерии способны расти на средах [ZoBell, 1943].

Таблица 2. Численность бактерий, ассоциированных с различными неаксеничными альгокультурами (средние величины приведены с доверительными интервалами)

Table 2. Abundance of bacteria associated with different non-axenic algal cultures (mean values are given with confidence intervals)

Альгокультура	Численность бактерий, кл.·мл ⁻¹	Метод	Источник
<i>Arthrospira platensis</i>	от 3×10^4 до 6×10^5	посевы на чашках	Тархова, 2005; Хадад и др., 1990; Falquet, Hurni, 2006; Wu, Pond, 1981
Различные штаммы <i>Arthrospira platensis</i>	от $2,1 \times 10^6$ до $1,3 \times 10^7$	окраска DAPI, ЛМ	Shiraishi, 2015
<i>Scenedesmus obliquus</i>	от $1,1 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^7$	окраска DAPI, ЛМ	Danger et al., 2007
<i>Pavlova lutheri</i> , <i>Platymonas suecica</i>	$(5,1 \pm 3,6) \times 10^6$, $(1,1 \pm 0,4) \times 10^7$	окраска акридином оранжевым, ЛМ	Nicolas et al., 1989
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Platymonas viridis</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i>	от 10^5 до 10^7	окраска SYBR Green I, ПЦ	Рауэн и др., 2011
<i>Arthrospira platensis</i> на различных стадиях роста культуры	от $6,7 \times 10^6$ до $1,7 \times 10^8$, $(0,9 \pm 0,6) \times 10^8$	обработка метанолом, УЗ, ЦФ; окраска SYBR Green I, ПЦ, СЭМ	данное исследование

Примечание: ЛМ — люминесцентная микроскопия; ПЦ — проточная цитометрия; УЗ — ультразвуковая обработка; ЦФ — центрифугирование; СЭМ — сканирующая электронная микроскопия.

Note: ЛМ, fluorescence microscopy; ПЦ, flow cytometry; УЗ, ultrasonic treatment; ЦФ, centrifugation; and СЭМ, scanning electron microscopy.

Именно поэтому в настоящем исследовании использован более точный и современный способ регистрации обилия микроорганизмов — проточная цитометрия после окраски флуорохромом повышенной яркости SYBR Green I. Отметим, что увеличению эффективности высвобождения бактерий способствовали предварительная физико-химическая пробоподготовка и серии промывочных процедур. Это согласуется с мнением авторов, которые изучают с помощью аналогичных методов численность микроорганизмов в пробах, содержащих большое количество частиц различной природы. Так, для донных осадков эффективность высвобождения бактерий из грунта на старте и после трёх промывок составляла 60–95 % от «потенциальной» кумулятивной численности микроорганизмов [Danovaro, Middelboe, 2010; Rylkova et al., 2019; Siem-Jørgensen et al., 2008]. Для микрофлоры, ассоциированной с культурой *A. platensis* (настоящее исследование), получены близкие показатели — 82,0–94,3 %. Промывки несколько увеличивали время обработки проб, но обеспечивали максимально полный учёт клеток.

Полученные нами количественные характеристики ассоциированной микрофлоры на различных фазах роста цианобактерий, от $6,7 \times 10^6$ до $1,7 \times 10^8$ кл.·мл⁻¹, согласуются с данными, описанными в литературе для альгокультур, при регистрации клеток бактерий с помощью люминесцентного микроскопа или проточного цитометра (табл. 2). Для различных штаммов

A. platensis численность ассоциированных бактерий составляла от $2,1 \times 10^6$ до $1,3 \times 10^7$ кл.·мл⁻¹ (при исследовании с помощью ЛМ после окраски DAPI) [Shiraishi, 2015]. Для *S. obliquus* (ЛМ, DAPI) количество микроорганизмов варьировало от $1,1 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^7$ кл.·мл⁻¹ [Danger et al., 2007]. В культурах *Pavlova lutheri* и *Platymonas suecica* содержалось $(5,1 \pm 3,6) \times 10^6$ и $(1,1 \pm 0,4) \times 10^7$ кл.·мл⁻¹ соответственно (ЛМ, акридиновый оранжевый) [Nicolas et al., 1989]. Т. Рауэн с соавторами [2011] (по данным проточной цитометрии после окраски SYBR Green I) показано, что численность микрофлоры, сопутствующей культурам *C. vulgaris*, *P. viridis*, *D. salina*, *I. galbana* и *T. weissflogii*, составляла от 10^5 до 10^7 кл.·мл⁻¹.

Таким образом, использованный нами подход предварительной физико-химической подготовки суспензии (экспозиция с метанолом, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование) вполне применим для изучения микрофлоры, ассоциированной с *A. platensis*, при регистрации количества бактерий с помощью проточной цитометрии после окраски SYBR Green I.

Известно, что для расчёта биомассы микрофлоры необходимо знать не только численность микроорганизмов, но и их объём (а значит, линейные размеры клеток), или использовать наиболее часто предлагаемые в литературе переходные коэффициенты, например в диапазоне от $1,7 \times 10^{-14}$ до $2,0 \times 10^{-14}$ г С·кл.⁻¹ [Alongi, 1988; Lee, Furman, 1987].

Оказалось, что применённые нами методы предварительной пробоподготовки (экспозиция с метанолом, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование) суспензии цианобактерий существенно улучшали качество микроскопических препаратов. Однако следует учитывать, что для любого вида микроскопии клетки бактерий проходят дополнительные процедуры обработки. В случае световой микроскопии и ЛМ, кроме фиксации, осуществляются окраска, фильтрация и сушка образца; при этом каждый этап может приводить к деформации и сжатию клеток. Известно, что после фиксации формалином и окраски клеток бактерий эритрозином происходило их «усыхание» в 1,3–2,5 раза (в среднем в 1,6 раза) [Потапова, Королевская, 1991; Сажин и др., 1987; Троицкий, Сорокин, 1967]. Применение флуорохромных красителей и ЛМ (когда нет этапа высушивания препарата) минимизировало искажение линейных размеров, при этом недостатком являлось быстрое выгорание фона (в случае использовании акридина оранжевого). Кроме того, объём бактерий, окрашенных DAPI, составлял 59 % объёма клеток, окрашенных акридином оранжевым [Posch et al., 2001; Suzuki et al., 1993]. Отметим, что промеры и определение морфологической принадлежности бактерий зачастую находятся на грани разрешающей способности оптических микроскопов.

СЭМ, позволяющая увеличить изображение более чем в 1000 раз, существенно снижает погрешности, которые связаны с измерениями клеток и с определением их морфотипов. Однако ещё более «жёсткая» подготовка образца для сканирующего электронного микроскопа (дегидратация в этаноле/ацетоне, последующая сушка в критической точке и напыление) тоже может приводить к деформации клеток. Известно, что при исследовании с помощью СЭМ происходит занижение «истинных» линейных размеров бактерий на 11–37 % (в среднем на 24 %) по сравнению с таковыми при анализе с помощью ЛМ [Fuhrman, 1981]. В таком случае средний объём бактериальной клетки должен быть скорректирован — увеличен в 2,5 раза: это верхний предел коэффициента «усушки», предложенный отечественными авторами [Потапова, Королевская, 1991; Сажин и др., 1987; Троицкий, Сорокин, 1967].

В данном исследовании при расчётах объёма клеток и биомассы микроорганизмов мы применяли среднюю величину коэффициента «усушки» бактериальных клеток 1,6 [Потапова, Королевская, 1991; Сажин и др., 1987] и оперировали значением содержания углерода в бактериальных клетках 11 % от сырой биомассы [Троицкий, Сорокин, 1967]. Интересно, что рассчитанная таким образом биомасса микрофлоры, сопутствующей культуре *A. platensis* ($0,022$ г·л⁻¹), была близка к биомассе, определённой с использованием переходного коэффициента $2,0 \times 10^{-14}$ г С·кл.⁻¹ ($0,025$ г·л⁻¹) [Lee, Furman, 1987].

Как мы указывали ранее для морского бактериопланктона [Рылькова, Поликарпов, 2021], при детальном изучении морфологической структуры микробного сообщества необходимо определение линейных размеров бактериальных клеток. Однако при отсутствии данных по непосредственным промерам клеток при расчётах биомассы допустимо использование переходных коэффициентов [Alongi, 1988; Lee, Furman, 1987].

Выводы:

1. При определении численности микрофлоры, ассоциированной с *Arthrospira (Spirulina) platensis*, предложено использовать комплексную физико-химическую пробоподготовку культуральной суспензии (обработка метанолом, перемешивание, ультразвуковая обработка и центрифугирование). Из культуры цианобактерий изначально извлекалось в среднем $(27,1 \pm 3,9) \%$ «потенциальной» кумулятивной численности бактерий. При последующих трёх промывках количество микроорганизмов достоверно увеличивалось в среднем до $(88,9 \pm 6,3) \%$ (парный t -тест; $p < 0,05$). Далее в осадке, состоящем из трихом *A. platensis*, количество микроорганизмов оставалось незначительным, 6–7 %, и этим можно было пренебречь.
2. Оптимальным методом регистрации численности сопутствующих культуре *A. platensis* бактерий являлась проточная цитометрия после окраски пробы флуорохромом повышенной яркости SYBR Green I. Численность бактериального ассоциата на разных стадиях роста *A. platensis* изменялась в пределах от $6,7 \times 10^6$ до $1,7 \times 10^8$ кл.·мл⁻¹, в среднем составляя $(0,9 \pm 0,6) \times 10^8$ кл.·мл⁻¹. Это сопоставимо с величинами численности бактерий, сопутствующих другим неаксеничным альгокультурам.
3. По данным сканирующей электронной микроскопии, на стационарной стадии роста *A. platensis* в сообществе сопутствующей микрофлоры доминировали (67,2 %) крупные палочковидные клетки; вклад извитых форм составлял 30,2 %; округлые формы встречались в 2,6 % случаев. Средний объём бактериальной клетки с учётом коэффициента «усушки» — $(0,16 \pm 0,02)$ мкм³.
4. Биомасса микроорганизмов в культуре *A. platensis* по «истинным» промерам клеток и при использовании коэффициента $2,0 \times 10^{-14}$ г·С·кл.⁻¹ составила 0,022 и 0,025 г·л⁻¹ соответственно, а значит, для расчёта биомассы бактерий при отсутствии данных по линейным размерам клеток вполне допустимо применение известных переходных коэффициентов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по темам «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 124021300070-2) и «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

Благодарность. Авторы признательны Е. А. Зубак, инженеру НОЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ, за помощь в работе на проточном цитометре, а также анонимным рецензентам за замечания и рекомендации, позволившие повысить качество статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Борисова Е. В. Видовой состав бактерий, сопутствующих микроводорослям в культуре (обзор литературы) // *Альгология*. 1996. Т. 6, № 3. С. 303–313. [Borisova E. V. Species composition of bacteria attendant to microalgae in culture (literary review). *Al'gologiya*, 1996, vol. 6, no. 3, pp. 303–313. (in Russ.)]
2. Звягинцев Д. Г. Оценка количества микроорганизмов в почвах разных типов // *Микроорганизмы в сельском хозяйстве* : труды II Межвузовской научной конференции 1968 г. Москва : Издательство Московского университета, 1970. С. 227–229. [Zvyagintsev D. G. Otsenka kolichestva mikroorganizmov v pochvakh raznykh tipov. In: *Mikroorganizmy v sel'skom khozyaistve* : trudy II Mezhhuzovskoi nauchnoi konferentsii

- 1968 g. Moscow : Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta, 1970, pp. 227–229. (in Russ.)]
3. Игнатенко М. Е., Немцева Н. В. Механизмы взаимодействия автотрофного и гетеротрофного компонентов в альгобактериальных сообществах // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2012. № 3. С. 1–10. [Ignatenko M. E., Nemtseva N. V. Mechanisms of interaction of autotrophic and heterotrophic components in algobacterial communities. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*, 2012, no. 3, pp. 1–10. (in Russ.)]
 4. Каленик Т. К., Добрынина Е. В., Остапенко В. М., Тори Я., Хироми Ю. Исследование пигментов сине-зелёной водоросли спирулины платенсис для практического использования в технологиях кондитерских изделий // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2019. Т. 81, № 2. С. 170–176. [Kalenik T. K., Dobrynina E. V., Ostapenko V. M., Torii Y., Hiromi J. Research of pigments of blue-green algae *Spirulina platensis* for practical use in confectionery technology. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta inzhenernykh tekhnologii*, 2019, vol. 81, no. 2, pp. 170–176. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2019-2-170-176>
 5. Кублановская А. А. *Микробные сообщества каротиногенной микроводоросли Haematococcus lacustris (Girod-Chantrons) Rostafinski (Chlorophyta) в природе и при культивировании* : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.01. Москва, 2019. 130 с. [Kublanovskaya A. A. *Mikrobnnye soobshchestva karotinogennoi mikrovodorosli Haematococcus lacustris (Girod-Chantrons) Rostafinski (Chlorophyta) v prirode i pri kul'tivirovanii*. [dissertation]. Moscow, 2019, 130 p. (in Russ.)]
 6. *Лабораторный практикум по общей микробиологии* / В. В. Слипень, Е. Ю. Кирильчик, Ж. Г. Шабан и др. ; 5-е изд. Минск : БГМУ, 2020. 80 с. [*Laboratory Workbook in General Microbiology* / V. V. Slizen, E. Yu. Kirilchik, Zh. G. Shaban et al. ; 5th ed. Minsk : BGMU, 2020, 80 p. (in Russ.)]
 7. Потапова Н. А., Королевская Т. В. К методике определения биомассы бактериальных клеток // *Гидробиологический журнал*. 1991. Т. 27, № 1. С. 83–88. [Potapova N. A., Korolevskaya T. V. On procedure to determine biomass of bacterial cells. *Gidrobiologicheskii zhurnal*, 1991, vol. 27, no. 1, pp. 83–88. (in Russ.)]
 8. Пуговкин Д. В. *Эпифитные бактериоценозы Fucus vesiculosus L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений* : дис. ... канд. биол. наук : 25.00.28. Мурманск, 2016, 138 с., 146 с. с прилож. [Pugovkin D. V. *Epifitnye bakteriotsenozы Fucus vesiculosus L. Barentseva morya i ikh rol' v degradatsii neftyanykh zagryaznenii*. [dissertation]. Murmansk, 2016, 138 p., 146 p. with suppl. (in Russ.)]
 9. Рауэн Т. В., Ханайченко А. Н., Муханов В. С. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания камбалы калкана // *Морской экологический журнал*. 2011. Т. 10, № 3. С. 48–56. [Rauen T. V., Khanaichenko A. N., Mukhanov V. S. Effect of microalgae and their filtrates on bacterial abundance in the rearing environment of the Black Sea turbot. *Morskoy ekologicheskij zhurnal*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 48–56. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/1171>
 10. Романенко В. И., Добрынин Э. Г. Определение удельного веса сухих бактериальных клеток *Pseudomonas denitrificans* // *Биология внутренних вод* : информационный бюллетень. 1973. № 16. С. 6–8. [Romanenko V. I., Dobyinin E. G. Determination of specific gravity of dry bacterial cells of *Pseudomonas denitrificans*. *Biologiya vnutrennikh vod* : informatsionnyi byulleten', 1973, no. 16, pp. 6–8. (in Russ.)]
 11. Рылькова О. А., Поликарпов И. Г. Сезонная динамика и пространственное распределение структурных показателей бактериопланктонного сообщества бухты Севастопольская (Крым, Чёрное море) // *Морской биологический журнал*. 2021. Т. 6, № 1. С. 82–101. [Rylkova O. A., Polikarpov I. G. Seasonal dynamics and spatial distribution of structural indicators of the bacterioplankton community of the Sevastopol Bay (the Black Sea). *Morskoy biologicheskij zhurnal*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 82–101. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.1.07>
 12. Сажин А. Ф., Мицкевич И. Н., Поглазова М. Н. Изменение размеров клеток бактериопланктона при фиксации и окрашивании // *Океанология*. 1987. Т. 27, № 1. С. 142–145. [Sazhin A. F., Mitskevich I. N., Poglazova M. N. Effect of fixation and staining on bacterial cell size characteristics. *Okeanologiya*, 1987, vol. 27, no. 1, pp. 142–145. (in Russ.)]

13. Тархова Э. П. Микроорганизмы, сопутствующие *Spirulina platensis* в накопительной культуре // *Экология моря*. 2005. Т. 70. С. 49–52. [Tarhova E. P. Microorganisms associated with *Spirulina platensis* (Nordst.) in accumulated culture. *Ekologiya morya*, 2005, vol. 70, pp. 49–52. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4705>
14. Троицкий А. С., Сорокин Ю. И. К методике расчёта биомассы бактерий в водоёмах // *Труды Института биологии внутренних вод*. 1967. Вып. 15. С. 85–90. [Troitsky A. S., Sorokin Yu. I. K metodike rascheta biomassy bakterii v vodoe-makh. *Trudy Instituta biologii vnutrennikh vod*, 1967, iss. 15, pp. 85–90. (in Russ.)]
15. Хадад Р. И., Багдасарян С. Н., Давидян Т. С., Африкян Э. К. Микроводоросль спирулина и её микрофлора // *Биологический журнал Армении*. 1990. Т. 43, № 3. С. 235–239. [Khadad R. I., Bagdasaryan S. N., Davidyan T. S., Afrikyan E. K. Mikrovodorosl' spirulina i ee mikroflora. *Biologicheskii zhurnal Armenii*, 1990, vol. 43, no. 3, pp. 235–239. (in Russ.)]. <https://arar.sci.am/publication/258206>
16. Шлегель Г. *Общая микробиология* : пер. с нем. Москва : Мир, 1987. 567 с. [Schlegel H. G. *Allgemeine Mikrobiologie* : transl. from German. Moscow : Mir, 1987, 567 p. (in Russ.)]
17. Alongi D. M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbial Ecology*, 1988, vol. 15, iss. 1, pp. 59–79. <https://doi.org/10.1007/BF02012952>
18. Ashen J. B., Goff L. J. Molecular and ecological evidence for species specificity and coevolution in a group of marine algal-bacterial symbioses. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 7, pp. 3024–3030. <https://doi.org/10.1128/aem.66.7.3024-3030.2000>
19. Bratbak G. Microscope methods for measuring bacterial biovolume: Epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* / P. F. Kemp, J. J. Cole, B. F. Sherr, E. B. Sherr (Eds). Boca Raton : CRC Press, 1993, chap. 36, pp. 309–318. <https://doi.org/10.1201/9780203752746>
20. Danger M., Oumarou C., Benest D., Lacroix G. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology*, 2007, vol. 21, iss. 2, pp. 202–210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01222.x>
21. Danovaro R., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M., Vanucci S. Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 3, pp. 1384–1387. <https://doi.org/10.1128/aem.67.3.1384-1387.2001>
22. Danovaro R., Middelboe M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems. In: *Manual of Aquatic Viral Ecology* / S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, C. A. Suttle (Eds). Waco, TX : American Society of Limnology and Oceanography, 2010, chap. 8, pp. 74–81.
23. Falquet J., Hurni J. P. *Spiruline, Aspects Nutritionnels*. [Sterling, VA] : Antenna Technologies, 2006, 41 p. (in French).
24. Faucher O., Coupal B., Leduy A. Utilization of sea water–urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1979, vol. 25, no. 6, pp. 752–759. <https://doi.org/10.1139/m79-109>
25. Frischer M. E., Danforth J. M., Newton Healy M. A., Saunders F. M. Whole-cell versus total RNA extraction for analysis of microbial community structure with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 7, pp. 3037–3043. <https://doi.org/10.1128/aem.66.7.3037-3043.2000>
26. Fuhrman J. A. Influence of method on the apparent size distribution of bacterioplankton cells: Epifluorescence microscopy compared to scanning electron microscopy. *Marine Ecology Progress Series*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 103–106.
27. Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, vol. 33, no. 5, pp. 1225–1228. <https://doi.org/10.1128/aem.33.5.1225-1228.1977>
28. Hoff K. A. Rapid and simple method for double staining of bacteria with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescein isothiocyanate-labeled antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, vol. 54, no. 12, pp. 2949–2952. <https://doi.org/10.1128/aem.54.12.2949-2952.1988>
29. Jung F., Braune S., Jung C. H. G., Krüger-Genge A., Waldeck P., Petrick I., Küpper J.-H. L. Lipophilic and hydrophilic compounds from *Arthrospira platensis* and its effects on tissue

- and blood cells – an overview. *Life*, 2022, vol. 12, iss. 10, art. no. 1497 (21 p.). <https://doi.org/10.3390/life12101497>
30. Kallmeyer J., Smith D. C., Spivack A. J., D'Hondt S. New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2008, vol. 6, iss. 6, pp. 236–245. <https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.236>
31. Kharchuk I. A., Rylkova O. A., Beregovaya N. M. State of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and of associated microflora during long-term storage in the state of anhydrobiosis. *Microbiology*, 2022, vol. 91, no. 6, pp. 704–712. <https://doi.org/10.1134/S0026261722601786>
32. Lee S., Furman J. A. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, no. 6, pp. 1298–1303. <https://doi.org/10.1128/aem.53.6.1298-1303.1987>
33. Lindahl V., Bakken L. R. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 1995, vol. 16, iss. 2, pp. 135–142. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(94\)00077-A](https://doi.org/10.1016/0168-6496(94)00077-A)
34. Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W., Simon M. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environmental Microbiology*, 2005, vol. 7, iss. 7, pp. 961–968. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00767.x>
35. Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaulot D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 1, pp. 186–193. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>
36. Morono Y., Terada T., Masui N., Inagaki F. Discriminative detection and enumeration of microbial life in marine subsurface sediments. *The ISME Journal*, 2009, vol. 3, iss. 5, pp. 503–511. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.1>
37. Nicolas J. L., Robic E., Ansquer D. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. *Aquaculture*, 1989, vol. 83, iss. 3–4, pp. 237–248. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90036-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90036-7)
38. Noble R. T., Fuhrman J. A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, vol. 14, no. 2, pp. 113–118.
39. Posch T., Loferer-Krößbacher M., Gao G., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R. Precision of bacterioplankton biomass determination: A comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001, vol. 25, no. 1, pp. 55–63.
40. Ramanan R., Kang Z., Kim B.-H., Cho D.-H., Jin L., Oh H.-M., Kim H.-S. Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. *Algal Research*, 2015, vol. 8, pp. 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.003>
41. Rylkova O. A., Gulin S. B., Pimenov N. V. Determination of the total microbial abundance in Black Sea bottom sediments using flow cytometry. *Microbiology*, 2019, vol. 88, iss. 6, pp. 700–708. <https://doi.org/10.1134/S0026261719060158>
42. Sapp M., Schwaderer A. S., Wiltshire K. H., Hoppe H.-G., Gerdt G., Wichels A. Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology*, 2007, vol. 53, iss. 4, pp. 683–699. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9162-5>
43. Seymour J. R., Amin S. A., Raina J.-B., Stocker R. Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships. *Nature Microbiology*, 2017, vol. 2, art. no. 17065 (12 p.). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>
44. Shiraishi H. Association of heterotrophic bacteria with aggregated *Arthrospira platensis* exopolysaccharides: Implications in the induction of axenic cultures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, vol. 79, iss. 2, pp. 331–341. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.972333>
45. Siem-Jørgensen M., Glud R. N., Middelboe M. Viral dynamics in a coastal sediment: Seasonal pattern, controlling factors and relations to the pelagic–benthic coupling. *Marine Biology Research*, 2008, vol. 4, iss. 3, pp. 165–179, suppl. material. <https://doi.org/10.1080/17451000801888718>
46. Solomonova E., Shoman N., Akimov A., Rylkova O., Meger Ya. Application of confocal microscopy and flow cytometry to identify physiological responses of *Prorocentrum micans* to the herbicide glyphosate. *Marine*

- Environmental Research*, 2024, vol. 196, art. no. 106417 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2024.106417>
47. Suzuki M. T., Sherr E. B., Sherr B. F. DAPI direct counting underestimates bacterial abundances and average cell size compared to AO direct counting. *Limnology and Oceanography*, 1993, vol. 38, iss. 7, pp. 1566–1570. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.7.1566>
48. Velji M. I., Albright L. J. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Canadian Journal of Microbiology*, 1986, vol. 32, no. 2, pp. 121–126. <https://doi.org/10.1139/m86-024>
49. Weinbauer M. G., Beckmann C., Höfle M. G. Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, no. 12, pp. 5000–5003. <https://doi.org/10.1128/aem.64.12.5000-5003.1998>
50. Wu J. F., Pond W. G. Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1981, vol. 27, iss. 1, pp. 151–159. <https://doi.org/10.1007/BF01611001>
51. ZoBell C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 1943, vol. 46, no. 1, pp. 39–56. <https://doi.org/10.1128/jb.46.1.39-56.1943>

**SPECIFICS OF SAMPLE PREPARATION
OF ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS CULTURE
IN THE STUDY OF ASSOCIATED MICROFLORA
BY FLOW CYTOMETRY AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

O. Rylkova, I. Kharchuk, A. Lelekov, V. Lishaev, and Ya. Zhondareva

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: ol.rylkova@yandex.ru

In biotechnological research, it is important to control quantitative characteristics of associated microflora in algal cultures. With the aim of more complete detection and detailed study of associated microflora in *Arthrospira (Spirulina) platensis* culture, we applied methods of physical and chemical preparation of samples and subsequent investigation of a suspension by flow cytometry after cell staining with SYBR Green I fluorochrome and scanning electron microscopy. As shown, optimal sample preparation options were exposure to a reagent (sodium pyrophosphate or methanol), suspension stirring, ultrasonic treatment, centrifugation, and additional washing procedures. A mean of $(27.1 \pm 3.9) \%$ of “potential” cumulative bacterial abundance was initially extracted from a cyanobacterial culture. During the following three washes, abundance of microorganisms increased significantly and averaged $(88.9 \pm 6.3) \%$ (paired *t*-test; $p < 0.05$). Further, abundance of microorganisms in the sediment remained insignificant, 6–11%, and could be neglected. As shown, bacterial abundance at different stages of *A. platensis* cultivation changed from 6.7×10^6 to 1.7×10^8 cells·mL⁻¹. The morphological structure of associated microflora in *A. platensis* at the stationary phase was dominated by large rod-shaped cells (67.2%); the proportion of spiral forms was almost twice as low (30.2%); and spherical forms were even less common (2.6%). The mean bacterial cell volume was $(0.16 \pm 0.02) \mu\text{m}^3$, and biomass was 0.022–0.025 g·L⁻¹. The values obtained for indicators of associated microflora are comparable to those provided in literature for *A. platensis* and other algal cultures. The proposed methods of treatment of *A. platensis* suspension boosted the efficiency of bacterial separation, facilitated removal of fragments of cyanobacterial trichomes, detritus, and other particles in samples, and provided an opportunity to study associated microflora by flow cytometry and scanning electron microscopy.

Keywords: Cyanobacteria, *Arthrospira (Spirulina) platensis*, associated microflora, bacteria, microorganisms, bacterial abundance, bacterial biomass, sample preparation methods, cell desorption, physical and chemical treatment, ultrasonic treatment, fluorescence microscopy, scanning electron microscopy, flow cytometry