

DOI 10.17516/1997-1389-0338

УДК 579

Comparison of Rapid Methods Used to Determine the Concentration, Size Structure and Species Composition of Algae

Egor S. Zadereev^{a,b*},
Anton V. Drobotov^a, Tatiana S. Lopatina^a,
Svyatoslav D. Ovchinnikov^b and Alexander P. Tolomeev^{a,b}

^a*Institute of Biophysics SB RAS
Krasnoyarsk, Russian Federation*

^b*Siberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 21.07.2020, received in revised form 20.10.2020, accepted 5.11.2020, published online 19.02.2021

Abstract. Traditionally, the abundance, cell size distribution and species identification of algae are determined by microscopic counts. In recent years, various rapid methods have been developed for routine algal studies. However, each of these methods has its drawbacks. It is important for aquatic ecologists to understand the advantages, disadvantages, and limitations of these methods. We compared the sensitivity of three rapid methods (multichannel fluorimeter FluoroProbe, imaging flow cytometer FlowCam, and CASY particle counter) to changes in cell abundance of three algae species (*Chlorella vulgaris* Beyerinck, *Arthrospira platensis* Gomont, and *Nostoc* sp.). We also assessed the ability of rapid methods to estimate the cell abundance of different species in the mixed samples. All instruments showed high sensitivity to changes in the cell abundance of different algae species and a mixture of these species. Any one of these methods, once calibrated, can be reliably used to estimate the abundance of a single-species/laboratory culture of microalgae. At the same time, FlowCam, without preliminary calibration, recorded the cell abundance closest to microscopic counts. When analysing a mixture of three microalgae differing in their cell sizes and spectral characteristics, FluoroProbe showed the highest accuracy in assessing the proportions of species in the mixture and FlowCam – in assessing their abundance. To study mixtures of algae and/or natural phytoplankton communities, it is advisable to use jointly a flow cytometer and a multichannel fluorimeter. The images of algae saved by the flow cytometer, if necessary, can be used to identify them, with a certain accuracy, to the species. Information on cells size and spectral characteristics obtained by two methods will be detailed enough

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: egor@ibp.ru

ORCID: 0000-0003-2366-8604 (Zadereev E.); 0000-0002-9124-4566 (Tolomeev A.)

to perform such common tasks as studying trophic interactions between phyto- and zooplankton or creating warning systems to inform of unwanted blooms of phytoplankton and their individual groups (for example, cyanobacteria).

Keywords: phytoplankton, fluorescence, particle counter, flow cytometry, microscopy, size distribution.

Acknowledgments. The research was supported by the grant of Krasnoyarsk Regional Scientific Foundation and Russian Foundation for Basic Research No. 19-44-240010. The authors are grateful to Elena Kravchuk and Elena Ivanova, for providing the cultures of cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *Nostoc* sp. and to two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript.

Citation: Zadereev E.S., Drobotov A.V., Lopatina T.S., Ovchinnikov S.D., Tolomeev A.P. Comparison of rapid methods used to determine the concentration, size structure and species composition of algae. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2021, 14(1), 5–27. DOI: 10.17516/1997-1389-0338

Сравнение экспрессных методов определения численности, размерной структуры и видового состава микроводорослей

Е. С. Задереев^{а, б}, А. В. Дроботов^а,
Т. С. Лопатина^а, С. Д. Овчинников^б, А. П. Толмеев^{а, б}

^аИнститут биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН

Российская Федерация, Красноярск

^бСибирский федеральный университет

Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. Традиционно численность, размерную структуру и видовую принадлежность микроводорослей определяют, подсчитывая и измеряя объекты разных видов под микроскопом. За последние годы для подобных исследований были разработаны различные экспрессные методы, каждый из которых не лишен своих недостатков. Исследователям водных экосистем важно понимать преимущества, недостатки и ограничения этих методов. Мы сравнили между собой и прямой микроскопией чувствительность трех экспрессных методов (многоканальный флуориметр FluoroProbe, визуализирующий проточный цитометр FlowCam, счетчик частиц CASY) к изменению численности клеток трех видов водорослей (*Chlorella vulgaris* Beyerinck, *Arthrospira platensis* Gomont и *Nostoc* sp.). Также мы оценили возможность использования экспрессных методов для восстановления видового состава смеси из этих видов. Все приборы показали высокую чувствительность к изменению численности клеток как разнотипных видов микроводорослей, так и смеси этих видов. Любой из методов после калибровки может быть надежно использован для оценки численности одновидовой/лабораторной культуры микроводорослей. При этом FlowCam без предварительной калибровки зафиксировал численность водорослей, наиболее

близкую к подсчитанной под микроскопом. При анализе смеси из трех различающихся по своим размерным и спектральным характеристикам микроводорослей FluoroProbe показал наиболее высокую точность при оценке соотношения видов в смеси, а FlowCam – при оценке численности. Для исследования смесей водорослей и/или природных проб фитопланктона целесообразно совместное использование проточного цитометра и многоканального флуориметра. Сохраненные проточным цитометром изображения водорослей при необходимости позволят с какой-то точностью определить их до вида. Размерные и спектральные характеристики, представленные двумя методами, дадут возможность охарактеризовать сообщество фитопланктона в объемах, необходимых для решения таких задач, как исследования трофических взаимодействий в паре фито- и зоопланктон или при создании систем предупреждения о нежелательных массовых развитиях фитопланктона и его отдельных групп (например, цианобактерий).

Ключевые слова: фитопланктон, флуоресценция, счетчик частиц, проточная цитометрия, микроскопия, размерное распределение.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта Краевого фонда науки и Российского фонда фундаментальных исследований № 19–44–240010. Авторы выражают благодарность Елене Кравчук и Елене Ивановой за предоставленные культуры цианобактерий *Arthrospira platensis* and *Nostoc* sp., а также двум анонимным рецензентам за ценные замечания к рукописи статьи.

Цитирование: Задереев, Е. С. Сравнение экспрессных методов определения численности, размерной структуры и видового состава микроводорослей / Е. С. Задереев, А. В. Дроботов, Т. С. Лопатина, С. Д. Овчинников, А. П. Толмеев // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2021. 14(1). С. 5–27. DOI: 10.17516/1997-1389-0338

Введение

Фитопланктон – одно из ключевых звеньев трофической цепи в водных экосистемах. Разнообразные по форме и строению, способные к фотосинтезу многочисленные виды водорослей и бактерий производят органическое вещество, которое потребляется растительным зоопланктоном и далее поступает к более высоким трофическим уровням, в том числе промысловым видам рыб, млекопитающим и птицам (Falkowski et al., 2003). Видовой состав и количество фитопланктона во многом определяют качество воды. В частности, «цветение» воды, вызываемое водорослями, является одной из глобальных экологических проблем (Gladyshev, Gubelit, 2019; Boyer et al., 2009; Willen, 2000; Namsaraev et al., 2020). Неудивительно, что исследование количественных

характеристик и видового состава фитопланктона – одна из стандартных гидробиологических задач. Традиционно для этих целей используют прямой счет клеток под микроскопом в отобранных в природе пробах (Лях и др., 2002). С одной стороны, эта задача достаточно трудоемка и требует высокой квалификации специалистов. С другой – прямой подсчет числа клеток и определение видового состава без дополнительной обработки данных не дает полной информации о сообществе фитопланктона. Для оценки обилия фитопланктона необходимо определить его биомассу, которую рассчитывают на основе взаимосвязи формы и размера клеток водорослей и их объема (Кузьмин, 1975). При этом традиционный, долгий по времени прямой метод учета численности фитопланктона не только ограничивает исследователя в количестве

анализируемых проб, но и не лишен прямых (из-за недоучета мелкоклеточных организмов) и косвенных (ошибки пересчета биомассы, зависимость качества подсчета от квалификации специалиста) недостатков (Mineeva, 2011).

За последние годы для количественных и качественных исследований фитопланктона были разработаны различные экспрессные методы. Для этих целей используют спектральные методы (MacIntyre et al., 2010), визуализирующую проточную цитометрию (Dashkova et al., 2017), счетчики частиц (Mulligan, Kingsbury, 1968). Каждый из этих методов не лишен недостатков, так как ориентирован на измерение лишь определенных параметров в сообществе или одновидовой культуре микроводорослей.

Спектральные методы обычно оценивают биомассу водорослей по содержанию в них хлорофилла «а». В частности, флуоресцентный метод основан на том, что интенсивность флуоресценции при определенных режимах освещения коррелирует с содержанием хлорофилла «а». Содержание хлорофилла в свою очередь коррелирует с биомассой водорослей (Гольд и др., 1986). Кроме хлорофилла, многие представители фитопланктона имеют вспомогательные фотосинтетические пигменты (фикоэритрин, фикоцианин, фукоксантин, перидинин и др.). Так как спектры возбуждения многих фотосинтетических пигментов перекрываются лишь частично, возможно подобрать такие длины возбуждающих волн, когда детектор будет принимать сигнал флуоресценции, характерный для светособирающего комплекса, в состав которого входят конкретные пигменты (Yentsch, Yentsch, 1979). В этом случае возможен не только количественный анализ характеристик, коррелирующих с биомассой фитопланктона (общее количество пигментов), но и функциональный анализ, разделяющий образец на несколько типичных отделов фитопланктона (например, зеленые и диатомовые водоросли,

цианобактерии и т. д.) (Гаевский, 2003; Kring et al., 2014). Однако точная идентификация видов в природной пробе фитопланктона этим методом невозможна.

Основное преимущество визуализирующей проточной цитометрии – быстрый анализ больших объемов и количества образцов (Sosik, Olson, 2007). Кроме того, автоматический захват изображения каждой частицы, проходящей через проточную камеру, предотвращает возможность необъективного учета клеток/частиц исследователем в случае визуальной микроскопии. Чтобы повысить точность измерения, проточный цитометр может быть совмещен с флуориметром. Так, проточный цитометр FlowCam получил широкое распространение благодаря объединенным возможностям микроскопии и спектроскопии (Graham et al., 2018). Еще одно преимущество визуализирующей проточной цитометрии – возможность оцифровки образцов *in vivo*, что исключает их хранение.

Счетчики частиц на основе возмущения электрического поля стали применяться для подсчета числа клеток водорослей с 60-х годов прошлого века (Reynolds et al., 2010). Во время измерения частицы, разведенные в проводящем ток растворе, проходят через небольшой капилляр, в котором создается электрическое поле. Прибор регистрирует изменения удельного сопротивления, пропорциональные объему частиц. В результате фиксируется как количество, так и размер частиц. При использовании этого метода можно получить информацию о количестве и размерном распределении частиц или клеток в пробе фитопланктона, однако невозможно оценить видовое разнообразие.

Для альгологов и исследователей водных экосистем важно понимать преимущества, недостатки и ограничения экспрессных методов оценки количества и видового состава фитопланктона. По мнению исследователей, визуализирующий проточный цитометр

FlowCam позволяет оценивать сезонные различия в видовом составе и численности фитопланктона в морских экосистемах с ошибкой, не превышающей данные световой микроскопии (Alvarez et al., 2014). С другой стороны, отмечается, что перед использованием проточной цитометрии в качестве альтернативы микроскопии требуются детальные сравнения результатов этих двух методов (Hryciuk et al., 2019). Многоканальные флуориметры в целом достаточно точно оценивают биомассу фитопланктона (Kring et al., 2014; Garrido et al., 2019). Однако при использовании этих приборов возможны и ошибки, связанные с вариацией концентрации пигментов в клетках под действием условий окружающей среды или образцами, где в больших количествах присутствуют крупные, формирующие колонии цианобактерии (Catherine et al., 2012). Счетчики частиц в целом показывают неплохие результаты для лабораторных и/или одновидовых культур, однако их точность может резко снижаться на природных многовидовых сообществах (Reynolds et al., 2010).

Таким образом, все косвенные методы оценки концентрации, размерного и видового состава фитопланктона имеют свои недостатки. Однако для многих задач водной экологии ключевыми являются чувствительность метода к изменению численности водорослей в среде и способность качественно оценивать изменения в видовом составе. Такая информация важна при исследовании трофических взаимодействий в паре фито- и зоопланктон (Knisely, Geller, 1986), при создании систем предупреждения о нежелательных массовых развитиях фитопланктона или отдельных видов (например, представителей цианобактерий) (Garrido et al., 2019).

В свете вышесказанного крайне важным представляется оценить точность экспрессных методов при их использовании в качестве

инструментов измерения численности клеток как отдельных культур водорослей, так и их смесей. В данной работе мы сравниваем между собой и с прямым счетом под микроскопом чувствительность трех экспрессных методов (многоканальный флуориметр, визуализирующий проточный цитометр, счетчик частиц) к изменению численности клеток нескольких видов фитопланктона. Также мы устанавливаем точность этих методов при оценке численности клеток в смеси из нескольких видов водорослей и возможность использования результатов экспрессных измерений для восстановления видового состава смеси.

Материалы и методы

Характеристика культур

В работе использовали лабораторные нестерильные культуры одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beyerinck и цианобактерий *Arthrospira platensis* Gomont и *Nostoc* sp. Далее для удобства культуры цианобактерий будем также называть микроводорослями.

Культуру *C. vulgaris* выращивали на среде Тамия при постоянном перемешивании и аэрации при температуре 25 ± 1 °C, постоянной освещенности около 6 кЛк.

Культуру *A. platensis* выращивали на среде Заррука в периодическом режиме (без аэрации и перемешивания) при температуре 25 ± 1 °C, освещенности около 6 кЛк и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота).

Альгологически чистую культуру *Nostoc* sp., выделенную из р. Енисей, выращивали на среде Громова без перемешивания и аэрации, при температуре 24 ± 1 °C, при постоянной освещенности около 2 кЛк.

Перед использованием клетки *C. vulgaris* концентрировали центрифугированием, водоросли *A. platensis* и *Nostoc* sp. брали непосредственно из культуры. Так как культура *A. platensis* в основном была представлена

длинными нитями, а культура *Nostoc* sp. – крупными колониями и пленками, перед экспериментом микроводоросли этих видов частично дефрагментировали с помощью ручного гомогенизатора-ступки.

Измерения

Для каждой из культур было приготовлено 10 растворов с последовательно уменьшающейся численностью клеток микроводорослей. Сначала для каждой из культур был приготовлен раствор с заведомо высокой численностью клеток. Линейку понижающихся численностей получали последовательным разведением в два раза изначального раствора, получившегося раствора, и т. д.

Также было приготовлено 15 смесей из трех микроводорослей с различными соотношениями численности клеток водорослей. Смеси готовили следующим образом. С помощью генератора случайных чисел были выбраны пятнадцать комбинаций из трех цифр, где каждая цифра могла принимать значение от 1 до 10. Далее смешивали в равных пропорциях (по 15 мл) приготовленные ранее растворы с различной численностью микроводорослей. Каждая цифра означала номер разведения (от 1 – самая высокая численность, до 10 – самая низкая). В качестве среды для всех разведений использовали отстоянную водопроводную воду.

Для каждого из разведений чистых культур или их смесей численность микроводорослей в среде измеряли с помощью следующих трех приборов:

Проточный цитометр FlowCam (FluidImaging Inc., США) совмещает возможности микроскопии и флуоресцентного метода. Прибор может работать в двух режимах: триггерном, когда учитываются только изображения частиц с флуоресцентным сигналом выше определенного порога, или автоматическом, в котором захватываются все изображения.

Для анализа капли жидкости помещается пипеткой в проточный канал, видимые объекты визуализируются на мониторе и изображения частиц автоматически сохраняются для создания библиотеки изображений образца. Для измерения флуоресценции хлорофилла «a» используется лазер, возбуждающий фотосинтетические пигменты отдельных клеток водорослей на длине волны 532 нм и два фотоприемника, детектирующие красную (длина волны ≥ 650 нм, детекция хлорофилла «a») и оранжевую (длина волны 575 ± 30 нм, детекция фикоэритрина) флуоресценцию.

Программное обеспечение прибора для каждого изображения частицы фиксирует около 40 параметров (ширина, длина, соотношение сторон (соотношение ширина/длина изображения), эквивалентный сферический диаметр (ESD), основанный на площади диаметр (ABD) и др.). В работе использовали капилляр толщиной 50 мкм. Измерения проводили при скорости протока 0,04 мл в минуту. Для каждого разведения через капилляр пропускали 0,2 мл жидкости. Таким образом, длительность каждого измерения составляла 5 мин. Измерения проводили в триггерном режиме, когда прибор захватывает изображения объектов лишь в том случае, когда флуоресцентный сигнал зарегистрирован хотя бы одним фотоприемником.

Счетчик частиц CASY TTC (Schärfe System GmbH, Германия) получает информацию о количестве и размере частиц от сигналов, которые создают объекты, проходящие через измерительную пору в поле низкого напряжения. Измерительная пора представляет собой откалиброванное по размеру отверстие, размещенное внутри капилляра. Электролит, которым заполнена измерительная пора, имеет определенное электрическое сопротивление. При прохождении через измерительную пору клетки вытесняют электролит и тем самым генерируют электрические импульсы. Коли-

чество электрических импульсов приравнивается к количеству частиц, а размер каждого импульса эквивалентен объему, так как каждая частица замещает количество электролита, равное ее объему. Измерения изменений напряжения при прохождении частиц проводят с частотой 1 МГц.

В работе применяли капилляр с диаметром измерительной поры 150 мкм. Для каждого разведения перед измерением разводили 0,1 мл воды с микроводорослями в 9,9 мл электролита. Режим измерения: объем жидкости, забираемой прибором, – 400 мкл, количество заборов – 3. Измерения проводили в трех повторностях. В анализах использовали среднее из трех измерений.

Многоканальный спектрофлуориметр FluoroProbe (bbe Moldaenke GmbH, Германия) оценивает концентрацию фотосинтетических пигментов в воде и различает основные отделы фитопланктона за счет использования шести различных светодиодов с длинами волн возбуждения 370, 470, 525, 570, 590 и 610 нм. Внутренние алгоритмы выделения различных отделов водорослей в образце основаны на следующих допущениях. Флуоресценция при возбуждении длиной волны 470 нм характерна для хлорофиллов «а» и «б», типичных для Chlorophyta (зеленые водоросли). Пик флуоресценции хлорофилла «а» при возбуждении длиной волны 525 нм связан с пигментом ксантофиллом фукоксантином, присутствующим у Bacillariophyta (диатомовые водоросли), или перидинином типичным для Dinophyta (динофлагелляты). Возбуждение длиной волны 570 нм фикозритрина, который может присутствовать как у Cryptophyta (криптофитовые), так и Cyanobacteria (цианобактерии), дает пик флуоресценции хлорофилла «а» у этих групп. Цианобактерии также демонстрируют максимум флуоресценции хлорофилла «а» при возбуждении фикоцианина на длине волны

610 нм. Для калибровки прибора используют флуоресцентный сигнал чистых культур видов, относящихся к разным отделам. На основании спектра флуоресценции образца и спектров эталонных культур прибор рассчитывает соотношение различных отделов водорослей в образце и общее количество пигментов, выраженное в единицах хлорофилла «а».

В работе были использованы заводские калибровки. Измерения проводили в кварцевой кювете объемом 30 мл. Каждое измерение проводили в течение 60 с, в течение которых прибор фиксировал до 15 значений сигналов флуоресценции. При анализе данных брали среднее этих значений.

Кроме этого, подсчитывали количество микроводорослей во всех пробах под микроскопом Микмед-5 (ЛОМО, Санкт-Петербург) при увеличении 400х в камере Горяева. Для каждого разведения фиксировали 15 мл воды с водорослями раствором Люголя. Далее для каждого разведения (чистые культуры или смесь культур) просчитывали клетки водорослей во всех 225 квадратах каждого из двух полей в трех камерах. Для *C. vulgaris* и *Nostoc* sp. подсчитывали количество клеток, для *A. platensis* – количество нитей, разделенных на 10 классов длины.

Анализ данных

В качестве характеристик культур водорослей счетчиком частиц CASY использовали частоту встречаемости частиц разного диаметра, средний диаметр и средний объем частицы, измеряемые прибором в автоматическом режиме.

В качестве характеристик культур водорослей проточным цитометром FlowCam использовали частоту встречаемости частиц разного диаметра; средний диаметр, основанный на площади (ABD), и средний объем частицы; среднее соотношение сторон и частоту встре-

чаемости частиц с различным соотношением сторон. Ранее было показано, что диаметр, основанный на площади, дает более точные оценки объема частиц в различном размерном диапазоне (Kydd et al., 2018). В качестве спектральных характеристик применяли доли частиц с флуоресцентным сигналом, связанным с возбуждением хлорофилла «a» (зеленые водоросли), и с флуоресцентным сигналом, связанным с возбуждением фикоэритрина (цианобактерии).

В качестве характеристик культур водорослей многоканальным флуориметром FluoroProbe использовали доли флуоресцентного сигнала в общем сигнале флуоресценции, связанные с возбуждением хлорофилла «a», фикоцианина и фикоэритрина, измеряемые прибором в автоматическом режиме.

Сравнение характеристик культур водорослей (средние диаметр, объем и соотношение сторон частиц; доли сигнала флуоресценции, связанные с различными пигментами) между разными видами и/или разными приборами осуществляли с помощью факторного дисперсионного анализа.

Для всех измерений определяли достоверность корреляционных зависимостей между подсчитанной под микроскопом и измеренной одним из приборов численностью водорослей. Точность каждого метода (Δ) для каждого вида водорослей или их смеси оценивали по среднему для всех разведений отношению измеренной к подсчитанной под микроскопом численностью водорослей.

Для решения обратной задачи – расчета численности различных водорослей в смеси осуществляли следующие подходы.

Пересчет. Зная исходную численность клеток водорослей в растворах, которые были использованы для приготовления смесей, мы рассчитали ожидаемую численность каждого из видов водорослей в каждой смеси.

FluoroProbe. С помощью многоканального флуориметра мы определили типичные для использованных культур водорослей сигналы флуоресценции. Для каждой из смеси водорослей был известен общий сигнал флуоресценции и доли сигналов, связанных с возбуждением хлорофилла «a», фикоцианина и фикоэритрина. Для определения доли клеток *Nostoc* в смеси культур использовали сигнал флуоресценции, связанный с фикоэритрином (так как этот сигнал в значимом количестве присутствовал в спектре флуоресценции только этого вида). Учитывая, что в спектральном отклике *Nostoc* также присутствуют сигналы, связанные с хлорофиллом «a» и фикоцианином, мы исключили долю *Nostoc* из общего сигнала флуоресценции смеси. Оставшаяся доля сигнала, связанная с фикоцианином, была отнесена к *Arthrospira*, а доля сигнала, связанная с хлорофиллом «a», – к *Chlorella*.

FlowCam. С помощью проточного цитометра мы определили типичные для использованных нами культур диаметры и соотношения сторон изображений микроводорослей. Для поиска изображений клеток *Chlorella* был создан фильтр small unicells (диаметр изображений – от 2 до 4 мкм, соотношение сторон – от 0,7 до 1). При применении такого фильтра в чистой культуре *Chlorella* выделяется 70 ± 3 % клеток, этот же фильтр в культурах *Arthrospira* и *Nostoc* выделяет лишь 3 ± 3 и 10 ± 3 % водорослей соответственно. Для поиска изображений нитей *Arthrospira* был создан фильтр long filaments (диаметр изображений – от 30 до 300 мкм, соотношение сторон – от 0 до 0,25). После применения каждого из фильтров выделенные изображения были просмотрены на предмет исключения микроводорослей заведомо других видов. Оставшиеся после применения фильтров small unicells и long filaments изображения относили к *Nostoc*.

Сходство между соотношениями водорослей в смесях, полученными на основе прямого счета под микроскопом, и соотношениями, рассчитанными одним из вышеупомянутых методов, для каждого метода оценивали по формуле

$$Similarity = \left| \left(1 - \frac{\frac{Chl \%_{расчет}}{Chl \%_{микр}} + \frac{Nost \%_{расчет}}{Nost \%_{микр}} + \frac{Art \%_{расчет}}{Art \%_{микр}}}{3} \right) \right|,$$

где для каждого из видов (*C. vulgaris* – Chl, *Nostoc* sp. – Nos или *A. platensis* – Art) $\%_{расчет}$ – доля клеток соответствующего вида в смеси по оценке одним из методов, $\%_{микр}$ – доля клеток каждого вида согласно прямому счету под микроскопом.

Результаты

Общая характеристика культур водорослей

Использованные в экспериментах виды микроводорослей различались размером, объемом, формой и спектральными характеристиками (табл. 1).

Для клеток *Chlorella* были характерны самые низкие значения среднего диаметра. Диаметр и объем клеток *Chlorella*, измеренные счетчиком частиц CASY, были больше, чем диаметр и объем клеток, измеренные проточным цитометром FlowCam. Однако эта разница была не достоверной (табл. 1). Детальное распределение частоты встречаемости клеток разного диаметра показывает (рис. 1), что для *Chlorella* характерны мелкие клетки диаметром до 5,5 мкм. Более 80 % клеток *Chlorella* имели соотношение сторон в диапазоне 0,7–0,9 (рис. 2). Таким образом, распределение клеток по диаметрам и соотношениям сторон соответствует виду круглых одиночных водорослей (рис. 3). В спектральном сигнале *Chlorella* при измерении как проточным цитометром FlowCam, так и многоканальным флуориметром FluoroProbe закономерно присутствовал только сигнал

флуоресценции, связанный с возбуждением хлорофилла «a» (табл. 1).

Для частиц в культуре *Nostoc* был характерен чуть более крупный диаметр. Как и для культуры *Chlorella*, разница между диаметром и объемом, измеренными счетчиком частиц CASY, и диаметром и объемом, измеренными проточным цитометром FlowCam, была не достоверной (табл. 1). Проточный цитометр FlowCam зафиксировал более сложную форму распределения микроводорослей *Nostoc* в зависимости от их диаметра по сравнению со счетчиком частиц CASY (рис. 1). Микроводоросли в культуре *Nostoc* имели относительно равномерное распределение в диапазоне соотношений сторон от 0,2 до 0,8 (рис. 2). Подобное распределение водорослей по размерам и соотношениям сторон соответствует культуре, в которой часть клеток собрана в небольшие колонии и/или нити (рис. 3).

В спектре флуоресценции культуры *Nostoc* при измерении проточным цитометром FlowCam и многоканальным флуориметром FluoroProbe зафиксирован схожий по доле сигнал, связанный с возбуждением фикоэритрина. Оставшийся флуоресцентный сигнал многоканальный флуориметр FluoroProbe разделял на флуоресценцию, связанную с возбуждением фикоцианина и хлорофилла «a». Проточный цитометр FlowCam в силу конструктивных особенностей не разделял оставшийся сигнал (табл. 1).

Нити в культуре водоросли *Arthrospira* имели самый большой средний диаметр. Диаметр и объем изображений, зафиксированные проточным цитометром FlowCam, были достоверно выше ($P < 0,01$), чем диаметр и объем частиц, измеренные счетчиком частиц CASY. Профиль распределения изображений и частиц по размеру показывает, что проточный цитометр FlowCam в отличие от счетчика частиц CASY регистрирует более 50 % изо-

Таблица 1. Размеры и спектральные характеристики клеток в культурах микроводорослей, измеренные с помощью счетчика частиц CASY, прочного цитометра FlowCam и многоканального флуориметра FluoroProbe

Table 1. Size and spectral characteristics of cells of selected algae species measured with particle counter CASY, flow cytometer FlowCam, and multichannel fluorimeter FluoroProbe

Вид водорослей	Средний диаметр, мкм		Объем, мкл		Соотношение сторон		Доли сигналов флуоресценции, связанные с возбуждением			
							хлорофилла «a», %		фикоцианина, %	
	CASY	FlowCam	CASY	FlowCam	FlowCam	FlowCam	Fluoro Probe	FlowCam	Fluoro Probe	FlowCam
<i>Chlorella vulgaris</i>	4,6±0,2 ^a	3,2±0,1 ^{ab}	454±74 ^a	20±1 ^a	0,80±0,01 ^a	1	1	0	0	0
<i>Nostoc</i> sp.	6,3±0,1 ^a	5,3±0,2 ^{ac}	614±62 ^a	210±17 ^a	0,54±0,01 ^a	0,15±0,01	0,75±0,04	0,59±0,01	0,26±0,01	0,25±0,02
<i>Arthrospira platensis</i>	9,1±0,4 ^a	17,0±0,9 ^{bc}	3156±210 ^a	7212±475 ^a	0,32±0,02 ^a	0,01±0,01	1	0,94±0,01	N/A	0,05±0,01
Значимость различия характеристики между видами										
^a p<0,01		^a p<0,02	^a p<0,001	^a p<0,001	^a p<0,001	^a p<0,001				
		^{b,c} p<0,001								

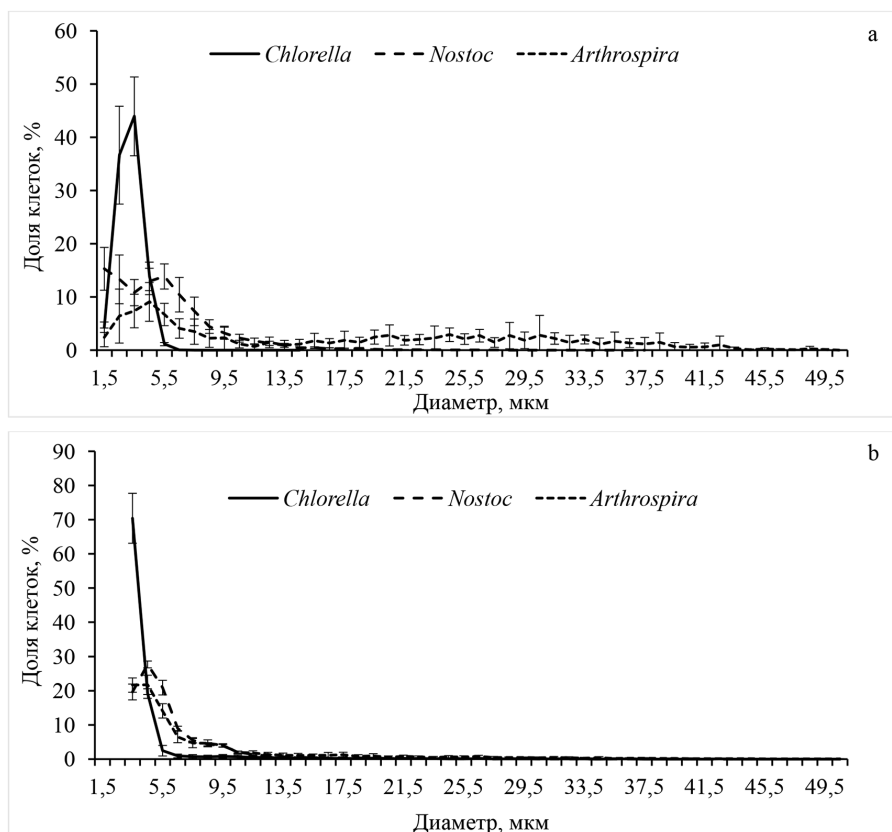


Рис. 1. Частоты встречаемости изображений и частиц с различным диаметром, полученные с помощью проточного цитометра FlowCam (a) и счетчика частиц CASY (b), для трех культур водорослей

Fig. 1. Image and cell diameter distributions for three species of algae measured by flow cytometer FlowCam (a) and particle counter CASY (b)

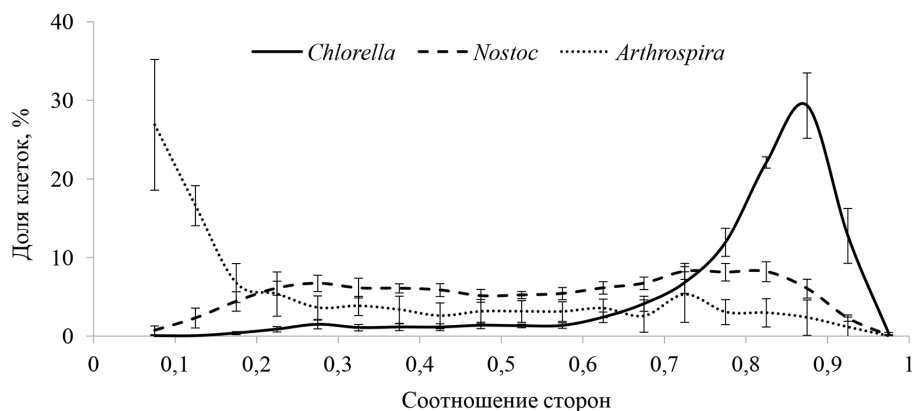


Рис. 2. Частота встречаемости изображений с различным соотношением сторон, полученная с помощью проточного цитометра FlowCam, для трех культур водорослей

Fig. 2. Image aspect ratio distribution for three species of algae measured with flow cytometer FlowCam

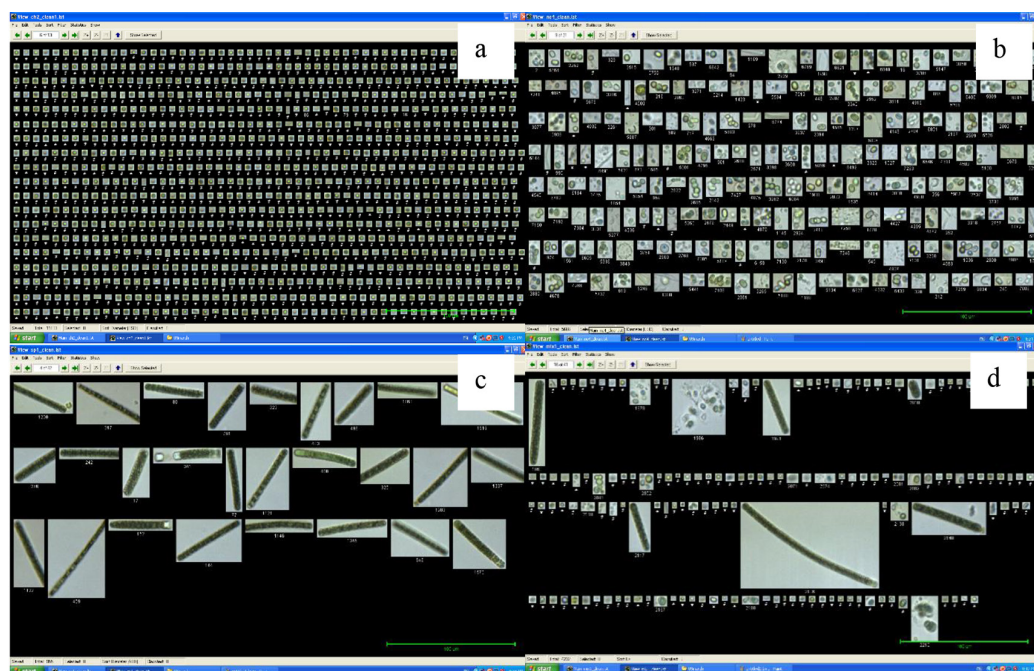


Рис. 3. Снимки культур водорослей *Chlorella vulgaris* (a), *Nostoc* sp. (b), *Arthrospira platensis* (c) и смеси этих трех культур (d), полученные с помощью проточного цитометра FlowCam

Fig. 3. Images of *Chlorella vulgaris* (a), *Nostoc* sp. (b), *Arthrospira platensis* (c), and mixture of these species (d) obtained with flow cytometer FlowCam

бражений в диапазоне диаметров 15–50 мкм (рис. 1). Около 50 % изображений в культуре *Arthrospira* имели соотношение сторон равное 0,1–0,2 (рис. 2). Подобное распределение изображений и частиц по размерам и соотношению сторон соответствует культуре нитчатых водорослей (рис. 3).

Проточный цитометр FlowCam спектр флуоресценции культуры *Arthrospira* связал с возбуждением хлорофилла «a». Многоканальный флуориметр FluoroProbe большую часть флуоресцентного сигнала культуры *Arthrospira* связал с возбуждением фикоцианина (табл. 1).

Оценка численности клеток водорослей разными методами

Для всех использованных приборов и видов водорослей корреляции между подсчитанной под микроскопом и измеренной численностью клеток были достоверными (рис. 4).

Использованные методы различались точностью определения численности клеток (табл. 2). При оценке численности *Chlorella* все методы показали близкие, заниженные примерно в три раза по сравнению с прямым счетом, значения. При оценке численности *Nostoc* счетчик частиц CASY продемонстрировал завышенные значения, тогда как проточный цитометр FlowCam и многоканальный флуориметр FluoroProbe численности – близкие к измеренным. При оценке численности *Arthrospira* счетчик частиц CASY и многоканальный флуориметр FluoroProbe показали существенно завышенные по сравнению с прямым счетом значения.

Оценка численности клеток и видового состава смеси водорослей

Корреляции между подсчитанной под микроскопом, ожидаемой согласно расчету и измеренной одним из методов численностью

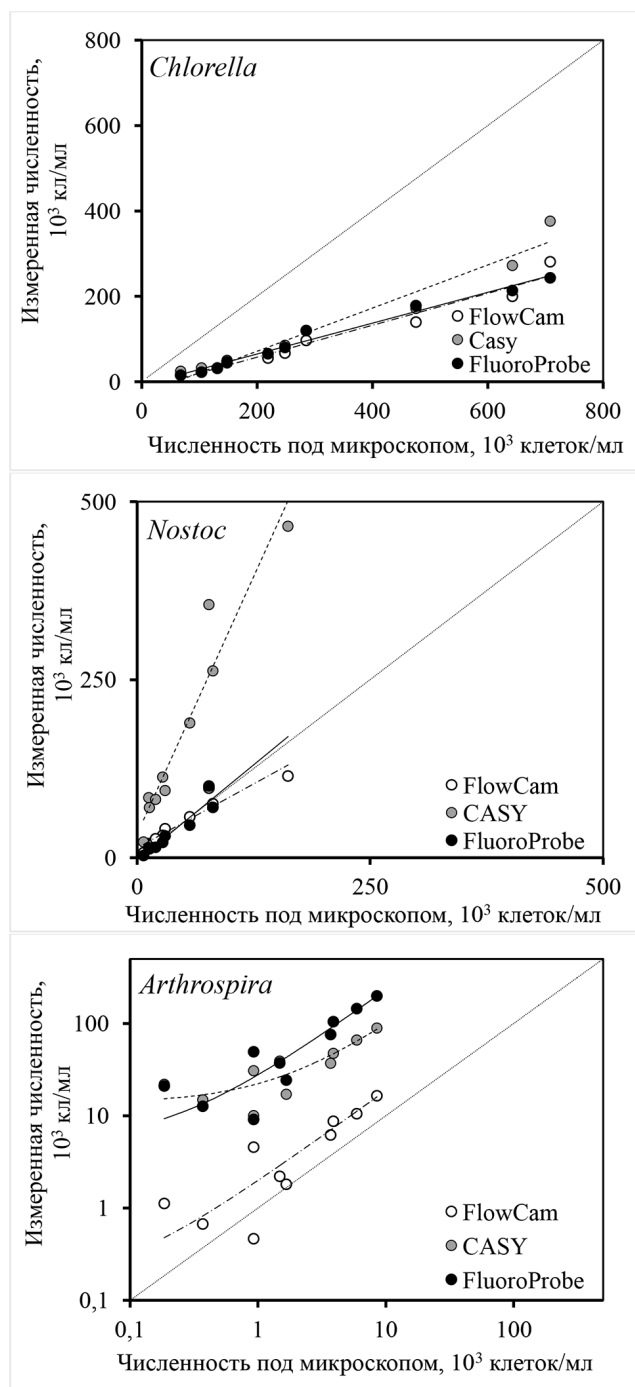


Рис. 4. Сравнение численности водорослей в чистых культурах, полученной прямым счетом под микроскопом и измеренной проточным цитометром FlowCam, счетчиком частиц CASY и многоканальным флуориметром FluoroProbe. Тонкая пунктирная линия – прямая соответствия численности по осям X и Y. Оси на графике для водоросли *Arthrospira* представлены в логарифмическом масштабе

Fig. 4. Comparison of abundances of three algae species obtained by microscope counts and by measurements with flow cytometer FlowCam, particle counter CASY, and multichannel fluorimeter FluoroProbe. Thin dotted line represents 1:1 line. Axes for *Arthrospira* are on logarithmic scale

Таблица 2. Коэффициенты регрессионных уравнений $y = a + b \cdot x$ (y – измеренная численность водорослей, x – подсчитанная под микроскопом численность водорослей); коэффициент детерминации (r^2) и отношение измеренной к подсчитанной под микроскопом численности водорослей (Δ) при оценке точности проточного цитометра FlowCam, счетчика частиц CASY и многоканального флуориметра FluoroProbe на чистых культурах водорослей. * – корреляция достоверна при уровне значимости $p < 0,001$

Table 2. Coefficients of linear regressions ($y = a + b \cdot x$) of microscopic abundance (x-axis) and rapid method abundance of algal cells (y-axis), coefficient of determination (r^2), and the ratio of rapid method abundance to microscopic abundance (Δ). Rapid methods are flow cytometer FlowCam, particle counter CASY, and multichannel fluorimeter FluoroProbe. * – correlations are significant at $p < 0.001$

Вид водорослей	Метод измерения	r^2	a	b	$\Delta \pm S.E$
<i>Chlorella vulgaris</i>	FlowCam	0,96*	-17,57	0,37	0,29±0,02
	CASY	0,96*	-30,13	0,50	0,36±0,03
	FluoroProbe	0,98*	-7,85	0,36	0,31±0,02
<i>Nostoc</i> sp.	FlowCam	0,94*	4,692	1,01	1,17±0,08
	CASY	0,91*	11,88	3,59	4,08±0,39
	FluoroProbe	0,90*	-4,15	1,07	0,88±0,08
<i>Arthrospira platensis</i>	FlowCam	0,94*	0,13	1,85	2,34±0,55
	CASY	0,89*	13,68	8,55	28,25±10,58
	FluoroProbe	0,95*	5,09	22,68	34,52±9,50

микроводорослей в смесях были достоверными (рис. 5). Ожидаемая и измеренная счетчиком частиц CASY численности оказались завышенными по сравнению с подсчитанной. Численности, измеренные проточным цитометром FlowCam и многоканальным флуориметром FluoroProbe, были близкими к подсчитанным под микроскопом (табл. 3).

При решении обратной задачи, определении численности водорослей в смеси, точность методов для разных видов существенно различалась (рис. 6, табл. 3). Расчетная численность *Chlorella* была существенно выше, чем подсчитанная под микроскопом. Численность *Chlorella*, измеренная проточным цитометром FlowCam и многоканальным флуориметром FluoroProbe, была близка. Численность *Nostoc* была достаточно точно оценена как расчетом, так и использованными алгоритмами пересчета на основе измерений проточным цитометром FlowCam и многоканальным флуориметром FluoroProbe. Наименьшая точность наблюдалась

при оценке численности *Arthrospira*. Алгоритм пересчета для многоканального флуориметра FluoroProbe существенно завышал ожидаемую численность клеток *Arthrospira*, тогда как алгоритм пересчета для проточного цитометра FlowCam – занижал.

При оценке сходства между соотношениями видов водорослей в смесях, полученными на основе прямого счета под микроскопом и рассчитанными одним из использованных методов, наиболее точные результаты оказались в случае восстановления соотношения с помощью многоканального флуориметра FluoroProbe (рис. 7).

Обсуждение

Характеристика культур водорослей

Различия в оценке размерных и спектральных характеристик культур водорослей различными методами были связаны с особенностями использованных приборов. В случае счетчика частиц CASY при использовании капилляра с из-

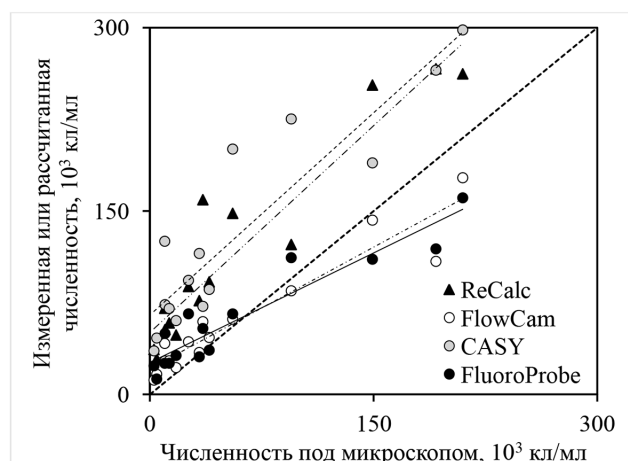


Рис. 5. Сравнение численности водорослей в смесях культур, полученной прямым счетом под микроскопом, пересчетом из численности в исходных растворах, и измерений проточным цитометром FlowCam, счетчиком частиц CASY и многоканальным флуориметром FluoroProbe. Тонкая пунктирная линия – прямая соответствия численности по осям X и Y

Fig. 5. Comparison of abundances obtained by microscope counts and calculated from abundance of algae in mixed samples; measured with flow cytometer FlowCam, particle counter CASY, and multichannel fluorimeter FluoroProbe. Thin dotted line represents 1:1 line

мерительной порой диаметром 150 мкм нижний предел измерений составляет 3 мкм. В результате прибор фиксирует большие по сравнению с проточным цитометром FlowCAM средний диаметр и объем частиц в культурах, где встречаются мелкие отдельные клетки.

Следующая особенность счетчика частиц связана с ошибкой при анализе количества колоний или нитей, состоящих из отдельных клеток водорослей. Эта особенность хорошо видна при сравнении распределений объектов в культурах трех видов водорослей, измеренных счетчиком частиц и проточным цитометром. В случае счетчика частиц все распределения имеют схожую форму с одним максимумом в области относительно мелких размеров. По всей видимости, при прохождении через измерительную пору крупной нити или колонии счетчик фиксирует отдельные сигналы от составляющих эти крупные объекты клеток. Ранее было отмечено, что силы, действующие в области измерительной поры, могут разрушать агрегаты частиц и тем самым изменять

размерное распределение частиц (Reynolds et al., 2010; Jakobsen, Carstensen, 2011).

Различия в оценке диаметра (размера) частиц оказывают существенное воздействие на оценку их объема. Для культур, в которых встречались преимущественно отдельные клетки водорослей (*Chlorella*, *Nostoc*), счетчик частиц CASY показывал более крупные объемы клеток, чем проточный цитометр FlowCam. Для нитчатой *Arthrospira* объем одной частицы по оценке проточного цитометра FlowCam существенно превышал объем частицы, измеренный счетчиком частиц CASY. Ранее было отмечено, что различия в оценке размеров клеток микроводорослей оказывают существенное воздействие на итоговые оценки их объема (Jakobsen, Carstensen, 2011). При этом авторы отмечают ряд проблем при сравнении проточного цитометра и счетчика частиц – различия в оценках размера и объема одноклеточных и нитчатых водорослей, влияние алгоритма расчета на итоговую оценку размера. Важный момент: авторы также отмечают серьезные

Таблица 3. Коэффициенты регрессионных уравнений $y = a + b \cdot x$; коэффициент детерминации (r^2) и отношение измеренной (для смеси) или восстановленной (для смеси и для видов в смеси) к подсчитанной под микроскопом численности водорослей (Δ). Численность водорослей в смеси была восстановлена на основе пересчета из численности исходных растворов (ReCalc); геометрических характеристик клеток, измеренных проточным цитометром FlowCam, или спектральных сигналов видов, измеренных многоканальным флуориметром FluoroProbe. * – корреляция достоверна при уровне значимости $p < 0,001$, ** – при уровне значимости $p < 0,01$

Table 3. Coefficients of linear regressions $y = a + b \cdot x$ of microscopic abundance (x-axis) and rapid method abundance of algal cells (y-axis), coefficient of determination (r^2), and the ratio of rapid method abundance (for the mixture) or calculated abundance (for mixture and for separate species) to microscopic abundance (Δ). Calculated abundances were counted based on the abundance of algae in mixed samples (ReCalc), geometric characteristics of algae measured with flow cytometer FlowCam, spectral signals of algae measured with multichannel fluorimeter FluoroProbe. * – correlations are significant at $p < 0.001$, ** – at $p < 0.01$

	Метод измерения / восстановления численности	r^2	a	b	$\Delta \pm S.E$
Смесь	ReCalc	0,88*	50,51	1,12	3,99±0,81
	FlowCam	0,90*	20,84	0,66	1,86±0,31
	CASY	0,82*	64,78	1,10	4,85±1,02
	FluoroProbe	0,87*	26,03	0,59	2,18±0,53
Вид водорослей	Метод восстановления численности				
<i>Chlorella vulgaris</i>	ReCalc	0,88*	42,47	1,22	5,19±0,96
	FlowCam	0,89*	13,37	0,64	1,94±0,31
	FluoroProbe	0,90*	7,95	0,48	1,06±0,12
<i>Nostoc</i> sp.	ReCalc	0,56*	6,76	0,91	2,61±0,76
	FlowCam	0,69*	7,25	0,75	2,65±0,64
	FluoroProbe	0,83*	4,96	0,67	2,75±1,03
<i>Arthrospira platensis</i>	ReCalc	0,81*	0,16	0,92	1,17±0,23
	FlowCam	0,43**	0,19	0,37	0,64±0,11
	FluoroProbe	0,81*	4,93	15,47	25,12±3,33

недостатки прямого счета фиксированных проб, так как в этом случае резко снижается количество обнаруживаемых в пробе клеток водорослей (Jakobsen, Carstensen, 2011).

При оценке спектральных характеристик видов водорослей различия между использованными приборами с очевидностью были связаны с их конструктивными особенностями. Многоканальный флуориметр FluoroProbe за счет наличия нескольких возбуждающих длин волн позволяет более точно охарактеризовать отделы водорослей с различными наборами пигментов. В то же время проточный цитометр FlowCam

за счет возможности выделять в сообществе фитопланктона виды, содержащие фикоэритрин, может быть использован для детекции определенных видов цианобактерий (Graham et al., 2018). В частности, разработаны протоколы для его использования как инструмента быстрого анализа видов рода *Microcystis*, которые часто выделяют токсины (Park et al., 2019; Wang et al., 2015).

Оценка численности клеток водорослей

Все использованные методы показали высокую чувствительность к изменению числа

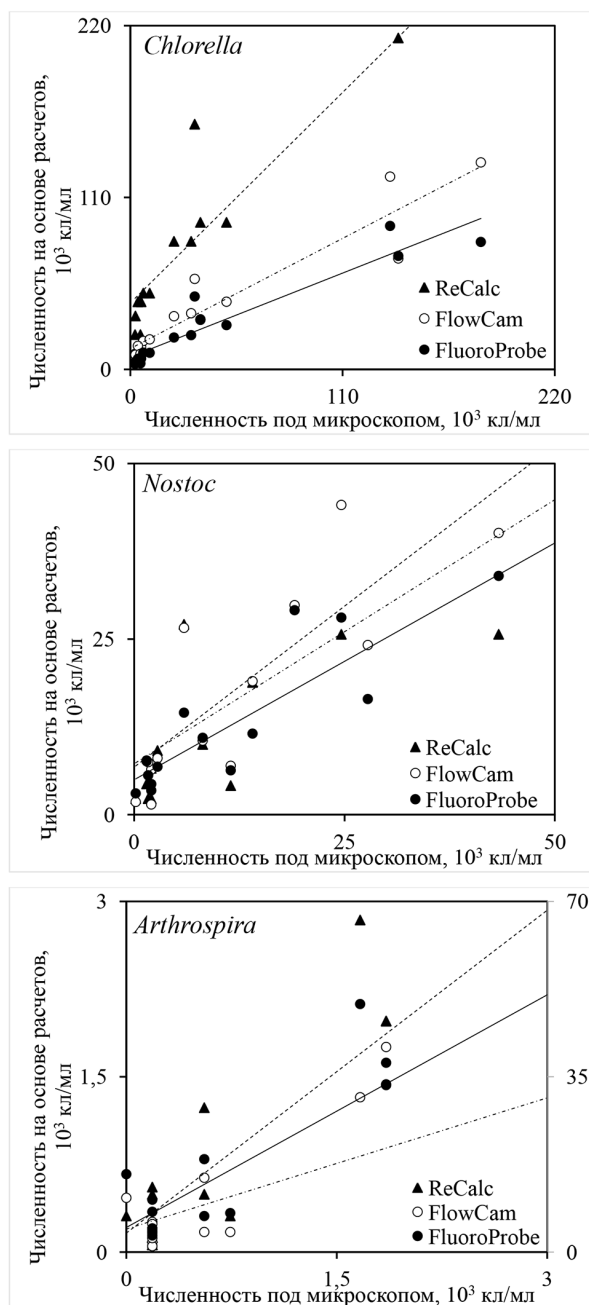


Рис. 6. Сравнение численности клеток в смеси трех видов микроводорослей, полученной прямым счетом под микроскопом и решением обратной задачи – восстановлением численности водорослей на основе пересчета из численности исходных растворов (ReCalc), геометрических характеристик клеток, измеренных проточным цитометром FlowCam, или спектральных сигналов видов, измеренных многоканальным флуориметром FluoroProbe. На графике для численности *Arthrospira* данные многоканального флуориметра FluoroProbe представлены на дополнительной оси Y

Fig. 6. Comparison of abundances of three algae species in mixtures obtained by microscope counts and calculated abundance based on the abundance of algae in mixed samples (ReCalc), geometric characteristics of algae measured with flow cytometer FlowCam, spectral signals of algae measured with multichannel fluorimeter FluoroProbe. Abundance of *Arthrospira* recalculated from signals measured with FluoroProbe is presented on secondary Y-axis

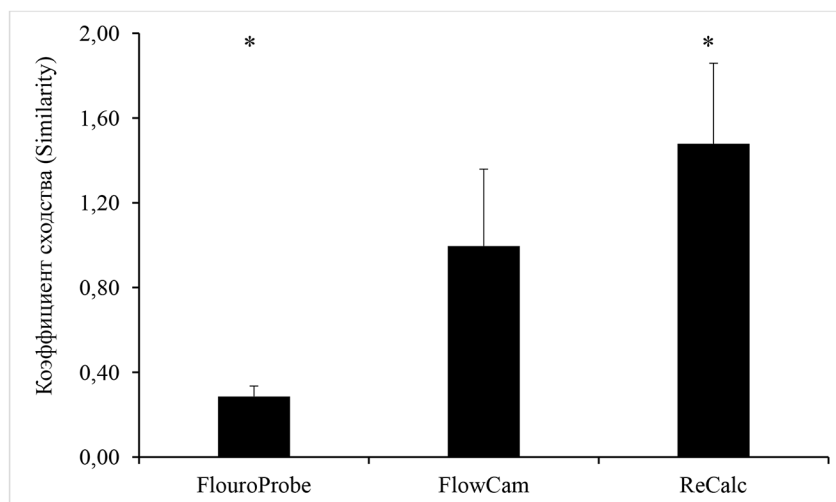


Рис. 7. Сходство между соотношениями водорослей в смесях, полученными прямым счетом под микроскопом и рассчитанными на основе пересчета из численности в исходных растворах (ReCalc), геометрических характеристик клеток, измеренных проточным цитометром FlowCam, или спектральных сигналов видов, измеренных многоканальным флуориметром FluoroProbe. * – $p < 0,01$

Fig. 7. Similarity between proportions of algae in mixtures obtained by microscope counts and calculations from abundance of algae in mixed samples (ReCalc), geometric characteristics of algae measured with flow cytometer FlowCam, spectral signals of algae measured with multichannel fluorimeter FluoroProbe. * – $p < 0.01$

клеток водорослей. При этом все регрессионные зависимости были линейными. Это означает, что при работе с одновидовыми сообществами любой из этих методов может быть использован для оценки изменения численности клеток водорослей. Такая чувствительность к морфологически различным видам фитопланктона крайне важна при проведении экспериментов по исследованию питания зоопланктона (Fulton, 1988). При этом ни один из методов не показал точного соответствия результатам определения численности микроводорослей прямым счетом под микроскопом. Это означает, что перед использованием любого из этих приборов для оценки изменения количества водорослей определенного вида требуется проведение калибровки.

При оценке численности клеток *Chlorella* все приборы показали близкие и заниженные по сравнению с прямым счетом результаты. Культуру одноклеточной водоросли *Chlorella* можно рассматривать как наиболее простой вид

водорослей для анализа. Клетки представляют собой практически идеальные сферы, редко собираются в агрегаты. В случае счетчика частиц CASY и проточного цитометра FlowCam заниженная численность *Chlorella*, по всей видимости, связана с неспособностью приборов определять наличие клеток ниже определенного размера (Hrucik et al., 2019). Экстраполируя ситуацию на натурные образцы, видим, что этот недостаток существен при оценке состава природного фитопланктона, так как приведет к недоучету мелких групп водорослей. В случае многоканального флуориметра FluoroProbe количество клеток оценивается путем автоматического пересчета сигнала флуоресценции с учетом калибровочных коэффициентов. Таким образом, для работы с конкретным видом возможна корректировка настроек прибора.

При оценке численности видов, клетки которых собираются в колонии или нити, наиболее точными к результатам микроскопии были результаты проточного цитометра FlowCam.

В целом, это ожидаемо, так как в основе работы FlowCam лежит автоматическая визуализация изображений. В использованном нами триггерном режиме визуализация сочетается с выделением флуоресцирующих объектов (микроводорослей). Ранее другие исследователи отмечали, что FlowCam позволяет получать данные, достаточно близкие к результатам прямой микроскопии (Álvarez et al., 2014). Счетчик частиц CASY и многоканальный флуориметр FluoroProbe при оценке численности нитчатой микроводоросли *Arthrospira* показали существенно завышенные значения. Для счетчика частиц это связано с уже упомянутой особенностью подсчитывать клетки, которые входят в состав нитей (Jakobsen, Carstensen, 2011). В случае флуориметра завышенный результат также понятен – при прямом счете фиксируется число нитей, тогда как флуориметр измеряет флуоресценцию каждой клетки, из которых состоят нити, и после пересчитывает сигнал флуоресценции в количество клеток по калибровочным коэффициентам. Таким образом, результаты, полученные счетчиком частиц и проточным флуориметром при измерении культуры нитчатых или колониальных водорослей, в каком-то смысле являются более точными, так как отражают общую биомассу.

Оценка численности и видового состава смеси водорослей

При оценке общей численности водорослей в смеси все методы, как и в случае одновидовых культур, показали чувствительность к ее изменчивости. При попытке количественно восстановить видовой состав смеси численность водорослей, оцененная на основе прямого счета под микроскопом числа клеток в смешиваемых растворах, оказалась существенно завышенной. Это указывает на то, что при прямом счете под микроскопом также возможны ошибки, связанные с особенностями фиксации или подсчетом

проб с низкой численностью клеток (Jakobsen, Carstensen, 2011).

Наша попытка восстановить состав смеси водорослей на основе геометрических и спектральных характеристик входящих в нее видов дала неоднозначные результаты. При учете всех приготовленных смесей наиболее близкое соотношение видов было восстановлено в случае использования спектральных характеристик водорослей, измеренных многоканальным флуориметром FluoroProbe. Напомним, что выбранные виды характеризовались наличием характерных пигментов. Если смотреть не на соотношения видов в смеси, а на их численность, то наиболее близкие оценки были получены с помощью проточного цитометра FlowCam. Стоит отметить, что точность оценки численности водорослей в смеси экспрессными методами зависела от соотношения видов в смеси. Наименьшую точность использованные методы показали при оценке численности нитчатых водорослей *Arthrospira*. Доля этих водорослей в смеси была невысокой. При других соотношениях использованных видов водорослей или видов, точность определения которых разными методами будет различаться, итоговый результат по восстановлению состава смеси также будет различаться. Очевидно, оптимальным с точки зрения баланса скорости и полноты характеристики сообщества фитопланктона будет одновременное использование проточного цитометра и многоканального флуориметра. К схожему выводу пришли авторы недавнего исследования (Menden-Deuer et al., 2020), сравнив оценку численности и размера лабораторных видов и природных проб фитопланктона несколькими методами.

Заключение

В данной работе мы оценили возможности использования экспрессных методов для определения численности, размерных и видо-

Таблица 4. Сравнительные характеристики использованных методов оценки численности, размерных и спектральных характеристик микроводорослей
 Table 4. Comparative characteristics of rapid methods used to estimate abundance, particle size distribution and spectral characteristics of algae

Метод	Скорость обработки одной пробы	Объем жидкости для анализа	Точность определения численности	Точность определения объема	Точность определения размера	Точность определения видового состава	Специальные преимущества
Прямой счет под микроскопом	30-60 мин	0,1 мл	Высокая	Средняя	Высокая	До вида	Высокая точность
Проточный цитометр FlowCam	5-10 мин	0,2-1 мл	Высокая	Средняя	Высокая	До отдела/вида*	Возможность сохранения изображений. Точность в определении и разнoобразии размерных характеристик.
Счетчик частиц CASY	5 мин	0,1 мл	Средняя	Средняя	Средняя	-	Высокая скорость и точность в определении размерных характеристик
Многоканальный флуориметр FluoroProbe	5 мин	50 мл	Средняя	Низкая	-	До отдела	Способность разделять фитопланктон на отделы. Корреляция результатов измерений с биомассой

* В случае последующего анализа сохраненных изображений специалистом.

вых характеристик микроводорослей, а также чувствительность этих методов к изменению числа клеток микроводорослей в среде. Изначально мы ориентировались на скорость обработки проб, так как задача быстрой обработки большого объема проб крайне важна, например, при проведении экспериментов по питанию зоопланктона или мониторинге многочисленных водных объектов. То есть в рамках данного исследования мы не рассматривали дополнительную калибровку или настройку приборов как способ увеличения их точности. С учетом этой задачи и полученных результатов можно кратко охарактеризовать использованные методы (табл. 4) и сделать следующие выводы.

Использованные приборы различаются точностью и детальностью описания культур водорослей. Проточный цитометр FlowCam характеризуется максимальным количеством параметров, описывающих как размерные, так и спектральные свойства клеток.

Все использованные приборы обладают высокой чувствительностью к изменению численности водорослей в среде. Любой из этих методов после соответствующей калибровки может быть надежно использован для оценки

численности клеток в одновидовой/лабораторной культуре водорослей. При этом проточный цитометр FlowCam без предварительной калибровки зафиксировал численность водорослей, наиболее близкую к подсчитанной под микроскопом.

При анализе смеси из трех различающихся по своим размерным и спектральным характеристикам видов водорослей многоканальный флуориметр FluoroProbe показал наиболее высокую точность при оценке соотношения видов водорослей в смеси, а проточный цитометр FlowCam – при оценке численности водорослей.

Для исследования смесей водорослей и/или природных проб фитопланктона целесообразно совместное использование проточного цитометра и многоканального флуориметра. Сохраненные проточным цитометром изображения клеток водорослей в дальнейшем позволяют с определенной точностью провести их идентификацию. Сочетание размерных и спектральных характеристик, предоставленное двумя методами, позволит достаточно полно охарактеризовать сообщество фитопланктона в объемах, необходимых для решения многих задач водной экологии.

Список литературы / References

Гаевский Н.А. (2003) *Критерии и методология оценки структурно-функционального состояния альгоценоза на основе флуоресцентного анализа. Диссертация ... доктора биологических наук*. Красноярск, КрасГУ, 286 с. [Gaevsky N.A. (2003) *Criteria and methodology for assessing the structural and functional state of algal community based on fluorescence analysis. Doctor of Science Dissertation*. Krasnoyarsk, Krasnoyarsk State University, 286 p. (in Russian)]

Гольд В.М., Гаевский Н.А., Шатров И.Ю., Попельницкий В.А., Рыбцов С.А. (1986) Опыт использования флуоресценции для дифференциальной оценки содержания хлорофилла у планктонных водорослей. *Гидробиологический журнал*, 22(3): 80–85 [Gold V.M., Gaevsky N.A., Shatrov I.Yu., Popelnitsky V.A., Rybtsov S.A. (1986) The experience of using fluorescence for differential estimation of the chlorophyll a content in planktonic algae. *Hydrobiological Journal* [Gidrobiologicheskij zhurnal], 22(3): 80–85 (in Russian)]

Кузьмин Г.В. (1975) Фитопланктон. Видовой состав и обилие. *Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов*. Мордухай-Болтовский Ф.Д. (ред.) М., Наука, с. 73 – 87 [Kuzmin G.V.

(1975) Phytoplankton. Species composition and abundance. *Methodology for studying biogeocenoses of inland water bodies*. Mordukhai-Boltovsky F.D. (ed.) M., Nauka, p. 73 – 87 (in Russian)]

Лях А.М., Суворов А.М., Брянцева Ю.В. (2002) Обзор методов количественного учета фитопланктона. *Системы контроля окружающей среды*, 4: 425–430 [Lyakh A.M., Suvorov A.M., Bryantseva Yu.V. (2002) The review of the methods for quantitative assessment of phytoplankton. *Monitoring Systems of Environment* [Sistemy kontrolya okruzhayushchej sredy], 4: 425–430 (in Russian)]

Álvarez E., Moyano M., López-Urrutia Á., Nogueira E., Scharek R. (2014) Routine determination of plankton community composition and size structure: a comparison between FlowCAM and light microscopy. *Journal of Plankton Research*, 36(1): 170–184

Boyer J.N., Kelble C.R., Ortner P.B., Rudnick D.T. (2009) Phytoplankton bloom status: Chlorophyll a biomass as an indicator of water quality condition in the southern estuaries of Florida, USA. *Ecological Indicators*, 9(6): S56–S67

Catherine A., Escoffier N., Belhocine A., Nasri A.B., Hamlaoui S., Yéprémian C., Bernard C., Troussellier M. (2012) On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Research*, 46(6): 1771–1784

Dashkova V., Malashenkov D., Poulton N., Vorobjev I., Barteneva N.S. (2017) Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis. *Methods*, 112: 188–200

Falkowski P.G., Laws E.A., Barber R.T., Murray J.W. (2003) Phytoplankton and their role in primary, new, and export production. *Ocean Biogeochemistry. Global Change – The IGBP Series (closed)*. Fasham M.J.R. (ed.) Berlin, Heidelberg, Springer, p. 99–121

Fulton R.S. (1988) Grazing on filamentous algae by herbivorous zooplankton. *Freshwater Biology*, 20(2): 263–271

Garrido M., Cecchi P., Malet N., Bec B., Torre F., Pasqualini V. (2019) Evaluation of FluoroProbe® performance for the phytoplankton-based assessment of the ecological status of Mediterranean coastal lagoons. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(4): 204

Gladyshev M.I., Gubelit Y.I. (2019) Green tides: new consequences of the eutrophication of natural waters (invited review). *Contemporary Problems of Ecology*, 12(2): 109–125

Graham M.D., Cook J., Graydon J., Kinniburgh D., Nelson H., Pilieci S., Vinebrooke R.D. (2018) High-resolution imaging particle analysis of freshwater cyanobacterial blooms. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(10): 669–679

Hrycik A.R., Shambaugh A., Stockwell J.D. (2019) Comparison of FlowCAM and microscope biovolume measurements for a diverse freshwater phytoplankton community. *Journal of Plankton Research*, 41(6): 849–864

Jakobsen H.H., Carstensen J. (2011) FlowCAM: sizing cells and understanding the impact of size distributions on biovolume of planktonic community structure. *Aquatic Microbial Ecology*, 65(1): 75–87

Knisely K., Geller W. (1986) Selective feeding of four zooplankton species on natural lake phytoplankton. *Oecologia*, 69(1): 86–94

Kring S.A., Figary S.E., Boyer G.L., Watson S.B., Twiss M.R. (2014) Rapid in situ measures of phytoplankton communities using the bbe FluoroProbe: evaluation of spectral calibration, instrument

intercompatibility, and performance range. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(7): 1087–1095

Kydd J., Rajakaruna H., Briski E., Bailey S. (2018) Examination of a high resolution laser optical plankton counter and FlowCAM for measuring plankton concentration and size. *Journal of Sea Research*, 133: 2–10

MacIntyre H.L., Lawrenz E., Richardson T.L. (2010) Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence. *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Developments in Applied Phycology*, 4. Suggett D., Prášil O., Borowitzka M. (ed.) Dordrecht, Springer, p. 129–169

Menden-Deuer S., Morison F., Montalbano A.L., Franzè G., Strock J., Rubin E., McNair H., Mouw C., Marrec P. (2020) Multi-instrument assessment of phytoplankton abundance and cell sizes in mono-specific laboratory cultures and whole plankton community composition in the North Atlantic. *Frontiers in Marine Science*, 7: 254

Mineeva N.M. (2011) Plant pigments as indicators of phytoplankton biomass (Review). *International Journal on Algae*, 13(4): 330–340

Mulligan H.F., Kingsbury J.M. (1968) Application of an electronic particle counter in analyzing natural populations of phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 13(3): 499–506

Namsaraev Z., Melnikova A., Komova A., Ivanov V., Rudenko A., Ivanov E. (2020) Algal bloom occurrence and effects in Russia. *Water*, 12(1): 285

Park J., Kim Y., Kim M., Lee W.H. (2019) A novel method for cell counting of *Microcystis* colonies in water resources using a digital imaging flow cytometer and microscope. *Environmental Engineering Research*, 24(3): 397–403

Reynolds R.A., Stramski D., Wright V.M., Woźniak S.B. (2010) Measurements and characterization of particle size distributions in coastal waters. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 115: C08024

Sosik H.M., Olson R.J. (2007) Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5(6): 204–216

Wang C., Wu X., Tian C., Li Q., Tian Y., Feng B., Xiao B. (2015) A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic *Microcystis* colonies by FlowCAM. *Journal of Applied Phycology*, 27(2): 711–720

Willén E. (2000) Phytoplankton in water quality assessment—an indicator concept. *Hydrological and limnological aspects of lake monitoring*. Heinonen P., Ziegler G., Van Der Beken A. (eds.) Wiley & Sons, Ltd, p. 58–80

Yentsch C.S., Yentsch C.M. (1979) Fluorescence spectral signatures: the characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *Journal of Marine Research*, 37(3): 471–483