DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-970 **EDN: DYTKGL**
УДК 631.461

Научная статья

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЧИСЛЕННОСТИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПРОКАРИОТ ТОРФА ВЕРХОВЫХ БОЛОТ

Д.А. Шпанов, И.Н. Зубов

Аннотация

Обоснование. Торф верховых болот как субстрат характеризуется рядом специфических условий, усложняющих отделение микробных клеток для цитометрический обработки. При этом отсутствие актуальных протоколов пробоподготовки, подходящих для капиллярных цитометров, требует подбор оптимальных условий выделения и окрашивания клеток.

Цель. Изучить влияния условий предобработки при цитометрическом определении общей численности прокариот (ОЧП) и количества жизнеспособных прокариот (КЖП).

Материалы и методы. Для отделения бактериальных клеток от субстрата применялась физико-химическая обработка с ультразвуком (УЗ), с поверхностно активными веществами (ПАВ) и этанолом в различных вариациях для фиксированных и свежих проб. Выделенные клетки окрашивались флуорохромами: Акридин оранжевый, PI, DAPI, SYBR Green I. Для увеличения выхода клеток из субстрата проводилась ступенчатая промывка с центрифугированием и фильтрацией через 50 мкм фильтр. Для определения численности прокариот использовался капиллярный проточный цитометр Luminex Guava® EasyCyte 12HT. Контрольным методом анализа выступала люминесцентная микроскопия на чёрных мембранных фильтрах.

Результаты. Определена оптимальная концентрация и продолжительность окрашивания проб при использовании различных флуорохромов. Для акридина оранжевого – 20 мкг/мл 30 минут; PI и DAPI – 10 мкг/мл 60 минут; SYBR Green I – 1 х 60 минут. Установлена оптимальная продолжительность УЗ обработки, позволяющая выделить из субстрата максимальное количество клеток при сохранении их целостности, а именно для КЖП –15 мин и ОЧП –

30 мин. Дополнительная обработка пробы ПАВами позволяет существенно увеличить количество выделяемых из субстрата клеток. Проведении 3-х ступенчатой промывки субстрата позволяет увеличить количество выделяемых клеток с 50-60 % до 89-93 %.

Выводы. Адаптирована методика цитометрического определения общей численности (ОЧП) и количества жизнеспособных прокариот (КЖП) для слаборазложившегося торфа верховых болот. Установлено, что предпочтительным методом пробоподготовки при определении общей численности бактерий является физико-химическая обработка с ПАВами (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)). Подтверждена необходимость повышения времени УЗ обработки до 30 минут без значимой потери численности клеточной фракции и введения 3-х ступенчатой промывки.

Ключевые слова: торф; общая численность прокариот; численность жизнеспособных клеток; проточная цитометрия; флуорохромы; пермеабилизация верховые болота

Для цитирования. Шпанов Д.А., Зубов И.Н. Применение проточной цитометрии для оценки численности и физиологического состояния прокариот торфа верховых болот // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2024. Т. 16, №6. С. 156-178. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-970

Original article

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO ASSESS THE ABUNDANCE AND PHYSIO LOGICAL STATE BACTERIA OF HIGH BOG PEAT

D.A. Shpanov, I.N. Zubov

Abstract

Background. Peat from upland bogs, as a substrate, is characterized by a number of specific conditions that make it difficult to separate microbial cells for cytometric analysis. At the same time, the absence of up-to-date protocols for sample preparation suitable for capillary cytometers necessitates the selection of optimal conditions for cell isolation and staining.

Purpose. To investigate the influence of pre-treatment conditions on cytometric assessment of the total count of prokaryotic cells (TCP) and the viable count of prokaryotes (TVP).

Materials and methods. To separate bacterial cells from their substrate, we used a combination of physical and chemical treatments, including ultrasound, surfactants, and ethanol in various forms, for both fixed and fresh samples. West and the cells with fluorochromes such as Acridine orange, PI (propidium iodide), DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), and SYBR Green. To maximize cell isolation, we performed stepwise flushing, ultrasound and centrifugation, followed by filtration through a 50 μm filter. We then determined the number of cells using a Luminex Guava® EasyCyte 12 HT capillary flow cytometer, and luminescent microscopy with black membrane filters served as a control.

Results. The optimal concentration and duration of staining of samples using various fluorochromes were determined. For acridine orange – 20 mcg/ml, 30 minutes; PI and DAPI – 10 mcg/ml, 60 minutes; SYBR Green I – 1 x, 60 minutes. The optimal duration of ultrasound treatment has been established, which allows the maximum number of cells to be isolated from the substrate while maintaining their integrity: for TCP (15 min) and TVP (30 min). At the same time, additional treatment of the sample with surfactants can significantly increase the number of cells isolated from the substrate. It is shown that a 3-stage washing of the substrate is necessary to increase the number of isolated cells from 50-60 % to 89-93 %.

Conclusion. The adaptation of the cytometric method for determining the total number and abundance of viable prokaryotes for poorly decomposed peat of upland bogs has been carried out. It was found that the preferred method of sample preparation in determining the total number of bacteria is physico-chemical treatment with surfactants (30 min ultrasound, Triton X-100 (0.1 %), PF (0.1 %)). The need to increase the ultrasound treatment time to 30 minutes, without significant loss of the number of cell fractions, has been confirmed.

Keywords: peat; bacteria; viable cells; riding bogs; flow cytometry; fluorochromes; permeability

For citation. Shpanov D.A., Zubov I.N. Application of Flow Cytometry to Assess the Abundance and Physio Logical State Bacteria of High Bog Peat. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2024, vol. 16, no. 6, pp. 156-178. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-6-970

Введение

Торфяные болота являются крупнейшим наземным стоком углерода, обеспечивая его накопления в залежи на протяжении многих веков. Это формирует их климатообразующую роль за счёт эмиссии углекислого газа и метана. Происходящие биохимические процессы во многом определяют интенсивность процессов и зависят от населяющих торфяную залежь микроорганиз-

мов. Микробные сообщества на протяжении десятилетий являются объектом изучения как отечественных, так и зарубежных специалистов. При этом особое внимание уделяется бактериям, как самой многочисленной группе [11].

Классически для определения общей численности микроорганизмов и оценки количества жизнеспособных форм в торфе применяется люминесцентная микроскопия на стекле или мембранных фильтрах [6; 13; 16]. Несмотря на простоту и относительную дешевизну, у данных методов есть существенные ограничения, заключающиеся в длительности проведения анализа, сложности одновременного применения нескольких красителей и относительной субъективности получаемых данных. Альтернативным методом анализа выступает проточная цитометрия – высокопроизводительный метод, позволяющий комплексно анализировать популяции клеток в различных видах субстратов.

Впервые использование проточной цитометрии для анализа почвенных бактерий было предложено в 1991 году Пейджем и Бернсом [23]. С тех пор цитометрия применяется отдельно или в сочетании с другими методами, демонстрируя тенденцию к более широкому использованию за последние три десятилетия [20]. Применительно к почвенным исследованиям, её преимущественно используют для определения численности прокариот. Проводимые исследования доказывают высокую сходимость результатов при повторных измерениях, достаточную чувствительность для сравнения численности в различных объектах [15; 24] и высокую корреляцию между проточной цитометрией и микроскопией [9]. Однако при изучении органогенных почв (торфа) и почв, содержащих большое количество взвешенного вещества, возникает проблема отделения клеток от носителей, на которых они ассоциированы в естественных условиях. Кроме того, многие флуоресцентные красители способны к неспецифическому связыванию с органическими и неорганическими частицами. Образующаяся при этом фоновая флуоресценция затрудняет определение бактерий вне зависимости от метода детекции. Для решения данных задач применяются различные протоколы пробоподготовки, отличные для каждого субстрата (чернозёмная почва, донные отложения и т.п.) [2; 24]. Это могут быть как классический протокол, предложенный Звягинцевым [27], так и различные модификации, заключающиеся в истирании проб торфа в ступке, диспергировании в гомогенизаторе, качалке или кратковременной обработке ультразвуком [6; 16; 20]. При этом для торфа верховых болот не выделяются отдельные протоколы пробоподготовки, несмотря на особенности, затрудняющие выделение клеточной фракции из субстрата и создающие высокий уровень фоновой флуоресценции (высокая кислотность, малая степень разложения, низкая зо-

льность, специфичный ботанический состав с доминированием сфагновых мхов, высокое содержание гуминовых веществ) [21; 26]. Дополнительно при применении проточных цитометров с капиллярной системой проточной ячейки производства Merc Milipore (серия Luminex Guava® EasyCyte) возникают трудности с засорением капилляра, возникающие по причине либо естественной агрегации исследуемых объектов и их адгезионной способности, либо попадания кусков субстрата > 50 мкм [12]. Поэтому возникают дополнительные требования при очистке клеток, и становится необходимым уменьшение адгезионной способности вносимых образцов. Известно, что для решения последней задачи используются поверхностно-активные вещества (ПАВ): ионные (пирофосфат натрия), неионные (Triton X-100, Twin 80). Кроме этого они увеличивают дисперсность торфа, упрощая выделение клеток. Также известно о применении этилового спирта для разрушения экзополимеров, которые удерживают микробные клетки [14; 18; 21].

Материал и методы исследования

Исследования проводили на ненарушенном участке Иласского болотного массива, расположенного в Приморском районе Архангельской области (64° 19’ 43» N, 40° 36’ 45» E). Отбор проб проводили в феврале 2023 года методом послойного бурения с применением пробоотборника для торфяных отложений из нержавеющей стали P 04.09 (EIJKELKAMP, Нидерланды). Для анализа использовали интегральные (усредненные с 5 торфяных кернов) 10-ти сантиметровые пробы, отобранные с глубин 0-50; 90-100 см.

Выбранный в качестве объекта торф верхового болота характеризуется кислой средой, высокой однородностью по ботаническому составу, доминирующим компонентом которого являются сфагновые мхи низкой степени разложения [28].

Пробоподготовка проводилась согласно предложенному алгоритму (Рисунок 1). Образцы для последующей обработки готовили в шести повторностях, отбирая несколько порций торфа с одного слоя. Суспензию торфа разводили в соотношении 1:100 (в качестве раствора разведения использовали 0,85 % NaCl). Для консервации проб использовали 50 % раствор глютеральдегида.

В качестве одного из методов пробоподготовки применяли физико-химическую обработку с поверхностно-активными веществами (ПАВ): пирофосфатом натрия (ПФ) и Triton X-100. В пробирку с фиксированной суспензией торфа добавляли Triton X-100 (10 % р-р), через 15 мин – пирофосфат натрия (10 % р-р) до конечной концентрации 0,1 % (каждого

реактива), выдерживали ещё 15 минут [5; 7]. Диспергировали пробу на ультразвуковой установке (УЗ) УЗВ-5,7 («Сапфир», Россия) в течение 30 минут (35 кГц, 150 Вт). После обработки УЗ крупные частицы отделяли центрифугированием (3 мин, 500 g) («Дастан», ЦЛн-16, Россия).

В качестве менее инвазивного метода применяли обработку с этанолом. В пробирку со свежеотобранной пробой без фиксации добавляли 10 % этанол до конечной концентрации 1 % и кратковременно встряхивали на вортексе (V-3 Elmi, Латвия). Образцы обрабатывали УЗ в течение 15 минут («Сапфир» УЗВ-5,7, Россия) (35 кГц, 150 Вт). Для удаления крупной неклеточной фракции центрифугировали (3 мин, 200 g) (Дастан ЦЛн-16, Россия) [14; 18].

Показатель общей численности прокариот был определён с использованием следующих флуорохромов: йодид пропидия (PI), SYBR Green I, Акридиновый оранжевый (AO), 4,6-диамиидно-2-фенилиндола (DAPI). В зависимости от выбранного красителя применялись следующие способы окрашивания:

- Окраску йодидом пропидия проводили в соответствии с протоколом [8]. К обработанной пробе добавляли рабочий раствор PI (100 мкг/мл) до конечной концентрации 10 мкг/мл, инкубировали 1 час.

- Окраску с SYBR Green I проводили в соответствии с общепринятым протоколом [25]. Использовали рабочий раствор 10 х, с оптической плотностью 1,102 ($\lambda = 667$, против mQ), до конечной концентрации в пробе – 1 х. Окрашивание проводили в течение 1 часа.

- Окраску бактерий AO проводили по стандартной методике [10]. К суспензии торфа добавляли 10 % рабочий раствор до концентрации 0,1 % в образце. Инкубировали 30 минут.

- Окрашивание DAPI проводили в соответствии с протоколом [14]. К образцу добавляли рабочий раствор DAPI (100 мкг/мл) до конечной концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали 1 час.

Определение жизнеспособных клеток заключается в измерении целостности клеточной стенки за счёт специфического связывания нескольких флуорохромов. Для оценки была применена модифицированная методика для Syto9 и PI [4]. В суспензию торфа (без фиксации) после пробоподготовки добавляли рабочий раствор 10х SYBR Green I до концентрации в пробе – 1 х, выдерживали в темноте 15 минут, после чего вносили рабочий раствор DAPI или PI (100 мкг/мл) до конечной концентрации в пробе – 10 мкг/мл, выдерживали в темноте 15 минут.

В качестве контрольного исследования применяли люминесцентную микроскопию. Подсчёт клеток вели с концентрированием клеток на черных мембранных фильтрах с размером пор 0,22 мкм [1]. Для однородного

распределения клеток мембранный фильтр матовой стороной вверх помещали на подложку из обеззоленного бумажного фильтра и закрепляли на специальном держателе. На мембранный фильтр вносили отмеренный объем пробы и окрашивали флуорохромами по ранее описанным методикам. После окрашивания удаляли жидкость с помощью вакуумного насоса, концентрируя клетки на поверхности мембранного фильтра. Разделив фильтр на 4 равные части, микроскопировали любые 3 под флуоресцентным микроскопом Altami bio2. На выбранных частях фильтра с помощью фотоаппарата фиксировали 10 полей зрения, на которых в программе «Altami Studio 3.0» были подсчитаны размеры и количество клеток.

Работу выполняли на проточном цитометре Luminex Guava® EasyCyte 12HT, оснащённом 3 лазерами для возбуждения флуоресценции меченых клеток: синим (488 нм), красным (642 нм) и фиолетовым (405 нм).

Использовался следующий режим работы прибора:

-Скорость подачи пробы-15 мкл/мин$^{-1}$;

-Количество событий – 10000;

-Количество событий в секунду – 300 – 800;

-Время анализа пробы – 60 секунд;

-Напряжение на датчиках:

-Blu-W (525/30) – 716 В;

-Green-B (450/45) – 743 В;

-Red-B (661/15) – 716 В;

-FSC – 5 В

-SSC – 10 В

-Пороговая величина (threshold) по FSC – 8;

Для проведения измерений применяли 96-луночные планшеты. Восемь проб чередовались с двумя лунками, содержащими MQ и фон, для нормализации измерений и отслеживания загрязнения проточной ячейки. Концентрацию клеток рассчитывали с учётом разбавлений, внесённого объёма флуорохромов, химических реагентов и режима работы прибора.

Для максимального выделения микроорганизмов из субстрата после пробоподготовки проводили ступенчатую промывку [25]. После центрифугирования в установленном для метода режиме надосадочная жидкость сливалась и использовалась для анализа, а осадок разбавлялся стерильным, фильтрованным через 0,22 мкм 0,85 % раствором NaCl. Полученную смесь перемешивали на вортексе, обрабатывали УЗ в течение 3 минут («Сапфир» УЗВ-5,7, Россия) (35 кГц, 150 Вт) и повторно центрифугировали. За кумулятивную численность прокариот в пробе принимали численность в наиболее эффективном методе после 10 промывочных процедур.

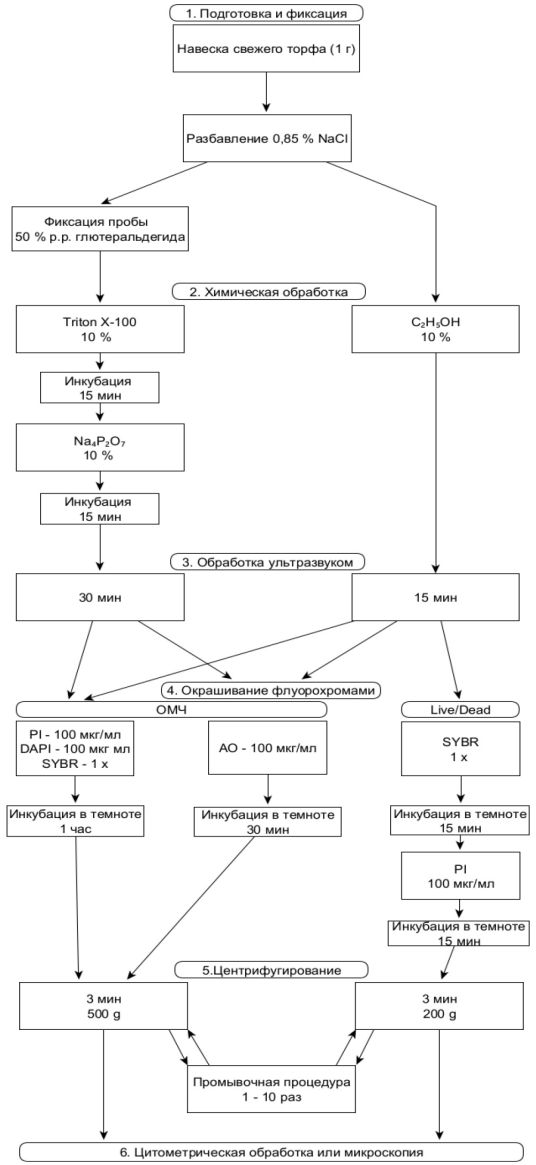

Рис. 1. Общий план с этапами отделения и окраски клеток, выделенных из торфа верхового болота

Первичную обработку аппаратных данных и построение цитограмм проводили в программном обеспечении GuavaSoft 3.1. и Floreada.io (https://floreada.io/analysis). Статистическую обработку проводили в программе Exel 2019, версия 2306 (сборка 16529.20154), используя надстройку «Анализ данных».

Результаты и обсуждение

Определены оптимальные концентрации красителей для цитометрического анализа, при которых достигаются максимальные значения показателя средней интенсивности флуоресценции клеточной фракции при минимальном фоновом шуме.

Для этого искали средний уровень флуоресценции (Δ MFI) при разной концентрации красителя в пробе торфа после обработки (30 мин УЗ, ПФ (0,1 %), Triton X-100 (0,1 %)). За искомую концентрацию принимали точку выхода на плато (Рисунок 2), учитывая, что средняя фоновая флуоресценция не должна быть больше 5 % от средней флуоресценции клеточной фракции.

По результатам измерений (Рисунок 2) установлены оптимальные концентрации флуорохромов, принятые для дальнейших измерений:

-SYBR Green I – 1 х;

-PI, DAPI – 10 мкг/мл;

-AO – 20 мкг/мл.

Более высокий ΔMFI при окраске SYBR не оказывает качественного влияния на количество детектируемых клеток, по сравнению с DAPI. Одновременно с этим в качестве контроля измерений общей численности прокариот нами использована люминесцентная микроскопия с окраской DAPI, что делает данный флуорохром предпочтительным для дальнейших калибровок режима обработки.

При УЗ обработке необходимо выдержать время, позволяющее выделить из субстрата максимальное количество клеток при сохранении их целостности. Для этого проводили серию измерений численности с разным временем УЗ обработки после предобработки Triton X-100 (0,1 %) и ПФ (0,1 %). Отделение микробных клеток от субстрата определяли по ΔMFI и светорассеиванию детектируемых частиц (Рисунок 3). Для нормализации флуоресценции и светорассеивания вносили флуоресцирующие шарики из комплекта Guava EasyCheck (BEAD) (Рисунок 3).

При краткосрочной обработке УЗ в течение 5 минут наблюдается большое количество крупной фракции. Мелкая фракция, соответствующая

бактериям, малочисленна (0,29 ± 0,01 × 10^7 кл/г). Увеличение времени обработки УЗ до 15 минут существенно повышает отделение искомых клеток (1,54 ± 0,08 × 10^7 кл/г), однако крупная окрашенная фракция до сих пор остаётся многочисленной. При 30 минутной обработке УЗ наблюдается максимальное количество отделённых клеток (1,93 ± 0,09 × 10^7 кл/г), минимальное количество крупноразмерной фракции и повышение среднего уровня флуоресценции в канале эмиссии флуорохрома (Blu-V (450/45)) (Рисунок 3). При обработке УЗ больше 60 минут численность клеточной фракции и средний уровень флуоресценции уменьшается, что может быть обусловлено разрушением бактерий.

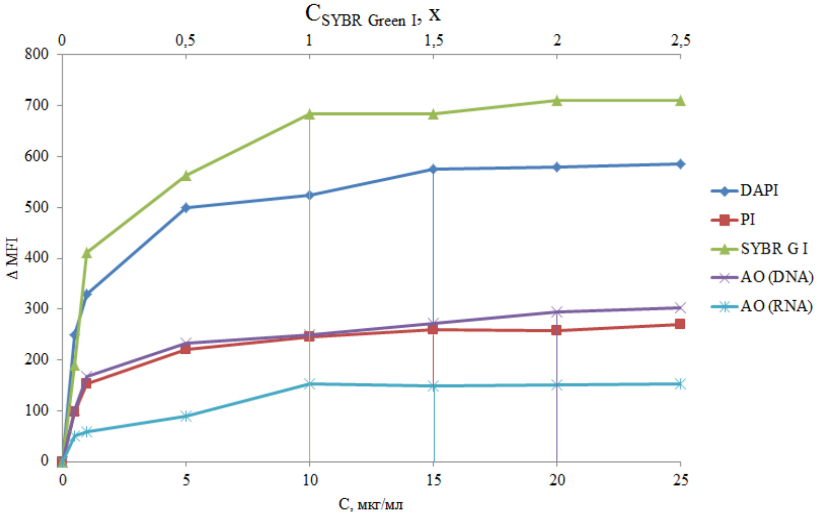

Рис. 2. Средняя интенсивность флуоресценции при разной концентрации красителя

Для дальнейших измерений общей численности бактерий мы использовали ультразвуковую обработку (УЗ) в течение 30 минут, как наиболее эффективную, и 15-минутную при определении жизнеспособных клеток, как менее инвазивную.

Для изучения влияния дополнительной химической обработки поверхностно активными веществами на количество выделенных клеток были поставлены параллельные пробы с физико-химической (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)) и физической обработкой (30 мин УЗ) (Рисунок 4, Таблица 1). Полученные данные свидетельствуют, что применение ПА-

Вов повышает эффективность выделения бактерий из субстрата на 9-22 %. По результатам 8-ми параллельных измерений установлено расхождение для физической обработки в 8,5-15,2 % и физико-химической в 4,5-7,3 %. Для очистки проб в обоих случаях применяли центрифугирование (3 мин, 500 g). Повышение эффективности отделения клеточной фракции объясняется уменьшением адгезионной способности бактерий к субстрату и повышением среднего уровня флуоресценции за счёт пермеабилизации клеток.

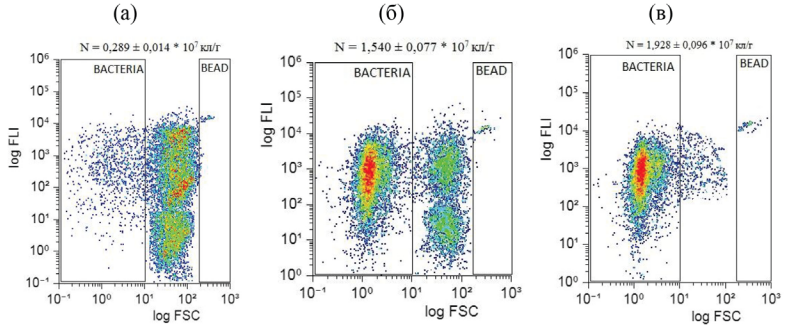

Рис. 3. Цитограммы торфа (после обработки УЗ, Triton X-100 и окраски DAPI: а – УЗ (5 мин), б – УЗ (15 мин), в – УЗ (30 мин).

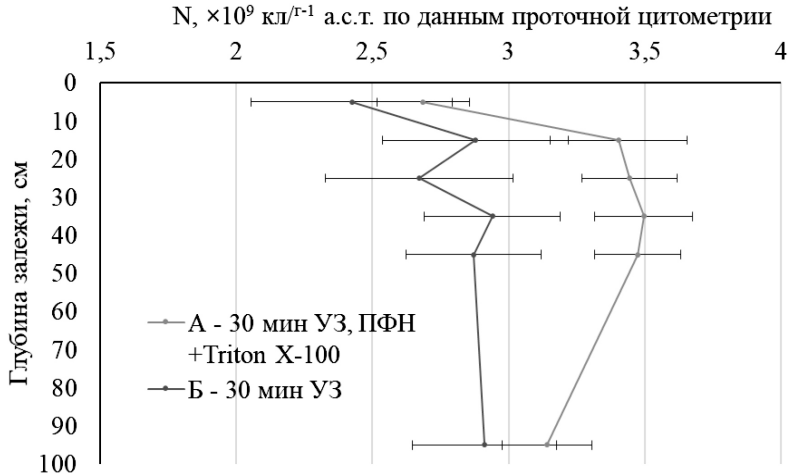

Рис. 4. Сопоставление численности бактерий (N) из различных слоёв торфяной залежи болотного массива при обработке:
А – физико-химическая (30 мин УЗ, ПФН + Triton X-100), Б – физическая (30 мин УЗ)

Измерение численности бактерий, проведённое во всех горизонтах торфяной залежи после физико-химической обработки с ПАВами (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)) показывает высокое число выделенных микробных клеток (Таблица 1). Окрашивание флуорохромами DAPI, PI, SYBR не показывает значимых различий в определении численности бактерий, находясь в диапазоне от 2,69 ± 0,13 × 10^7 до 3,59 ± 0,18 × 10^7 кл/г а.с.т (парный t-тест, $p > 0.05$). Увеличенная численность определяемой фракции при окраске АО (4,22 ± 0,21 — 4,93 ± 0,25 × 10^7 кл/г) может быть вызвана неспецифическим связыванием флуорохрома с мелкой фракцией субстрата. Наблюдается качественное отделение клеточной фракции на цитограмме без необходимости нормализации показателей (Рисунок 5, б).

Таблица 1.

Численность бактерий в различных горизонтах торфяной залежи при различной обработке

Обработка Triton X-100, ПФ, УЗ 30 мин, ×10^7, кл/г					
Исследуемый горизонт, см	АО	DAPI	PI	SYBR	Контроль
5	4,221 ± 0,211	2,686 ± 0,134	2,712 ± 0,136	3,015 ± 0,151	2,955 ± 0,739
15	4,838 ± 0,242	3,403 ± 0,170	3,261 ± 0,163	3,455 ± 0,173	3,743 ± 0,936
25	4,891 ± 0,245	3,444 ± 0,172	3,533 ± 0,177	3,494 ± 0,175	3,789 ± 0,947
35	4,928 ± 0,246	3,496 ± 0,175	3,542 ± 0,177	3,520 ± 0,176	3,845 ± 0,961
45	4,808 ± 0,240	3,474 ± 0,174	3,592 ± 0,180	3,434 ± 0,172	3,822 ± 0,955
95	4,473 ± 0,224	3,140 ± 0,157	3,481 ± 0,174	3,195 ± 0,160	3,454 ± 0,863
Обработка этанолом, УЗ 15 мин, ×10^7, кл/г					
5	3,976 ± 0,149	1,477 ± 0,074	1,492 ± 0,075	2,914 ± 0,146	3,255 ± 0,814
15	3,451 ± 0,173	1,872 ± 0,094	1,793 ± 0,09	3,310 ± 0,160	3,543 ± 0,886
25	3,683 ± 0,184	1,894 ± 0,095	1,943 ± 0,097	3,345 ± 0,167	3,849 ± 0,962
35	3,921 ± 0,176	1,923 ± 0,096	1,948 ± 0,097	3,468 ± 0,173	3,545 ± 0,886
45	3,132 ± 0,172	1,911 ± 0,096	1,975 ± 0,099	3,591 ± 0,165	3,722 ± 0,930
95	2,726 ± 0,136	1,727 ± 0,086	1,915 ± 0,096	2,976 ± 0,144	3,254 ± 0,813

Измерение численности бактерий после физико-химической обработки с этанолом (15 мин УЗ, C_2H_5OH (1 %)) позволяет достоверно отделить клеточную фракцию (Рисунок 5, а). Однако при окраске флуорохромами DAPI, АО и PI детектируется на 40-50 % меньше, чем при обработке ПАВами (Таблица 1). SYBR определяет численность бактерий без значимых различий, обеспечивая в среднем расхождение между методами в 2,5 %,

что находится в пределах погрешности измерения проточного цитометра Luminex Guava® EasyCyte 12HT [12].

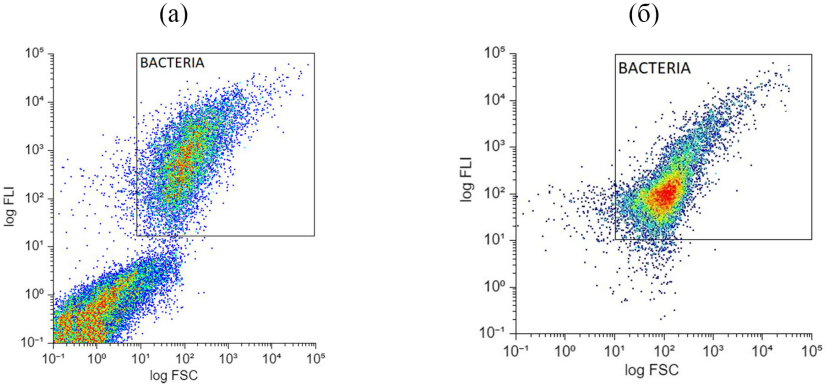

Рис. 5. Цитограммы определения общей численности прокариот в торфе (горизонт 30-40 см) после обработки: а – этанолом, б – ПФ + Triton X-100

При пробоподготовке торфа для определения количества жизнеспособных микроорганизмов основная сложность заключается в необходимости максимального отделения клеток от субстрата при сохранении целостности клеточных стенок. По этой причине фиксация пробы и подсчёт после физико-химической обработки с ПАВами (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)) не представляется возможным из-за пермеабилизации клеток микроорганизмов ПАВами, приводящей к связыванию неинтактных красителей со всей клеточной фракцией. Длительная обработка ультразвуком и фиксация проб также способны повреждать клеточные стенки, что существенно влияет на результаты анализа [3].

Обработка УЗ в течение 15 минут и этанолом (1 %) позволяет разделять клеточную фракцию на 2 искомые субпопуляции (Рисунок 6). Субпопуляция 1 включает в себя все клетки, окрашенные SYBR и отображает общее количество клеток в пробе. Субпопуляция 2 включает только клетки, окрашенные PI или DAPI с повреждёнными клеточными стенками. По соотношению численности между ними мы можем найти процентное содержание жизнеспособных клеток. Для лучшего программного отделения одинаковой по размерам неклеточной фракции мы нормировали значения по интенсивности флуоресценции и применили преобразование Logicle, разработанное в Стэнфорде [22]. Оно помещает события, близкие к нулю в линейном масштабе, и более крупные события в логарифмическом мас-

штабе. Это помогает распределять большие группы событий вокруг нуля, что может быть проблемой, если визуализация данных идёт в логарифмическом масштабе.

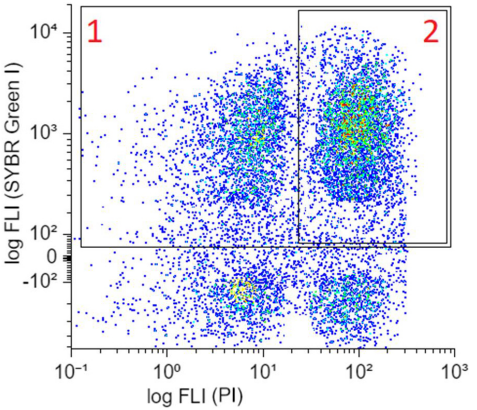

Рис. 6. Цитограммы определения жизнеспособных микроорганизмов проб торфа: (горизонт 30-40 см): 1 – все клетки, 2 – нежизнеспособные клетки

Несмотря на разную интенсивность флуоресценции, между DAPI и PI не наблюдается значимых различий (парный t-тест, $p > 0,05$) (Таблица 2). Совместное использование SYBR Green I и AO не представляется возможным из-за наложения спектров эмиссии флуорохромов при связывании с ДНК.

Таблица 2.

Количество жизнеспособных микроорганизмов в торфе верхового болота при окраске различными флуорохромами

Количество жизнеспособных микроорганизмов, %			
Исследуемый горизонт, см	DAPI	PI	Котроль, PI
5	20,3	20,6	21,2
15	23,6	22,5	23,1
25	24,2	26,1	24,9
35	31,7	32,1	31,5
45	33,2	33,4	33,5
95	50,4	50,1	51,1

Контроль измерений проводили методом эпифлуоресцентной микроскопии. Общую численность бактерий проводили с окраской DAPI. По

количеству определяемых бактериальных клеток методы пробоподготовки в контроле не имеют статистически значимой разницы (парный t-тест, $p > 0,05$) за счёт возможности подсчёта слабоокрашенных или ассоциированных на субстрате клеток (Таблица 1). При этом цитометрический анализ, который более чувствителен к качеству отделения клеток и нормализации интенсивности флуоресценции, даёт результаты, аналогичные контролю только при физико-химической обработке с поверхностно-активными веществами (ПАВами) (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)) (Таблица 1). Проведённый парный корреляционный анализ показывает высокую взаимосвязь между численностью бактерий, определяемой методом люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии ($R^2 = 0,86$) (Рисунок 7).

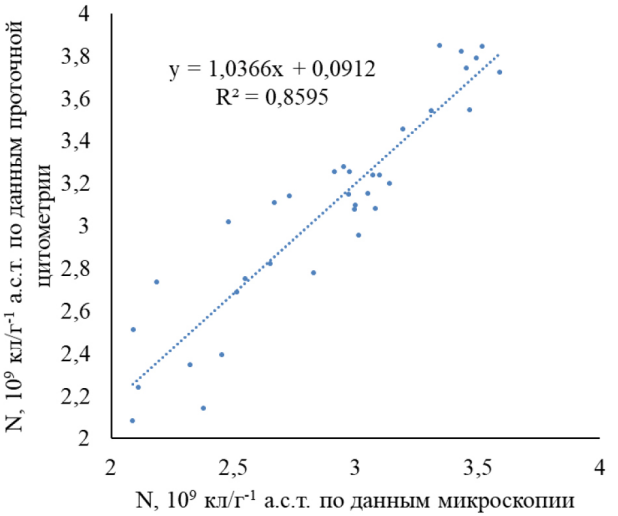

Рис. 7. Сопоставление численности бактерий (N) из различных слоёв торфяной залежи болотного массива после обработки УЗ, Triton X-100 и окраски DAPI при подсчёте с помощью эпифлуорисцентной микроскопии и проточной цитометрии

В контроле при определении жизнеспособных бактерий наблюдается более высокая численность клеток, чем при цитометрии, что в свою очередь значимо не влияет на процентное соотношение жизнеспособных и мёртвых клеток в пробах (парный t-тест, $p > 0,05$). Тем не менее, применение менее инвазивных методов отделения клеток от субстрата и отсутствие пермеабилазации при цитометрической обработке уменьшает суммарное количество выделенных клеток, что не позволяет использовать их как по-

казатель общей численности бактерий. Низкий процент живых клеток и равномерность распределения по слою залежи объясняется уменьшением температуры залежи и промерзанием верхнего слоя.

При отсутствии промывочных процедур выделение микробных клеток относительно кумулятивной численности варьировалось от 66 ± 10 % при обработке пирофосфатом натрия + Triton X-100 и 50 ± 9 % при обработке этанолом. При проведении 3-ёх промывочных процедур увеличивали выделение клеток до 93 ± 3 % и 89 ± 2 % соответственно. Дальнейшие промывки (до 10 ступеней), незначительно увеличивали выделение клеток, при этом разница между полученными значениями и кумулятивной численностью была недостоверной (парный t-тест, $p > 0,05$). Разумеется, в кумулятивную численность входят не все клетки, так как небольшая часть остаётся на субстрате даже после 10-ти промывочных процедур, однако их доля незначительная и не оказывает влияние на результат. Можно утверждать, что при обязательных трёх промывках будет выделяться большая часть клеточной фракции.

Выводы

Проведена адаптация методики цитометрического определения общей численности и численности жизнеспособных прокариот для слаборазложившегося торфа верховых болот.

Установлено, что предпочтительным методом пробоподготовки при определении общей численности бактерий является физико-химическая обработка с ПАВами (30 мин УЗ, Triton X-100 (0,1 %), ПФ (0,1 %)). Подтверждена необходимость повышения времени УЗ обработки до 30 минут без значимой потери численности клеточной фракции.

PI, SYBR Green I и DAPI при обработке пирофосфатом натрия и Triton X-100 не показали значимых различий и могут в равной мере применяться для определения общей численности прокариот. Полученные данные варьируются в одном порядке от $2,69 \pm 0,13 \times 10^7$ до $3,59 \pm 0,18 \times 10^7$ кл/г$^{-1}$ а.с.т. Применение АО ограничивается сильной фоновой флуоресценцией, выражающейся в неспецифическом связывании с субстратом. Также замечена повышенная адгезия АО, приводящая к быстрому засорению проточной ячейки цитометра Luminex Guava® EasyCyte 12HT.

Обработка проб этанолом оказалась наиболее подходящей при определении количества жизнеспособных бактерий. Установлено, что неполное выделение клеточной фракции значимо не влияет на соотношение (парный t-тест, $p > 0,05$). При определении количества жизнеспособных микроор-

ганизмов не замечена разница от использования PI и DAPI. Их вариация возможна при наличии в пробе пигментов, флуоресцирующих в спектрах эмиссии одного из представленных красителей. Полученные значения для верхового болота колеблются от 20 до 52 %, что соответствует данным других исследователей [4; 16].

Применение проточной цитометрии, по сравнению с люминесцентной микроскопией, позволяет значительно ускорить подсчёт клеток, однако для обеспечения наиболее полного выделения клеток оказалось необходимо проведение промывочных процедур. В зависимости от метода пробоподготовки количество изначально выделенных клеток может варьироваться до 50-60 %. Несомненно, дополнительные 3 промывочные процедуры значительно увеличивают время анализа и расход реактивов, но это обеспечивает выделение до 89-93 % от кумулятивной численности прокариот.

Информация о спонсорстве. Исследование выполнено за счет средств Министерства высшего образования и науки Российской Федерации (проект № 122011400386-6)

Список литературы

1. Асташкина А.П. Анализ микрофлоры воды и воздуха: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» // Томский политехнический университет. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015, 25 с.
2. Постовалов, А. А. Выявление факторов, определяющих микробиологическую активность биоценоза / А. А. Постовалов, С. Ф. Суханова, Ю. А. Курская // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2022. Т. 14, № 1. С. 286-302. https://10.12731/2658-6649-2022-14-1-286-302
3. Buesing N., Gessner M.O. 2002. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles plant litter and epiphytic biofilm // Aquat. Microb. Ecol, 2002, vol. 27, pp. 29–36. https://doi.org/10.3354/ame027029
4. Bogdanova O.Y., Golovchenko A.V., Lysak L.V., Glukhova T.V., Zvyagintsev D.G. Viability of bacteria in peatlands // Eurasian soil science, 2014, vol. 47, pp. 297-303. https://doi.org/10.1134/S1064229314020033
5. Button D. K., Robertson B. R. Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry // Applied and Environmental Microbiology, 2001, vol. 67, no. 4, pp. 1636-1645. https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1636-1645.2001

6. Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Kukharenko O.S., Yakushev A.V., Semenova T.A., Inisheva L.A. The structure of the microbial communities in low-moor and high-moor peat bogs of Tomsk oblast // Eurasian Soil Sc, 2012, vol. 45, pp. 273–281. https://doi.org/10.1134/S1064229312030039
7. Danovaro R., Middelboe M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems // Manual of Aquatic Viral Ecology. ASLO, 2010, vol. 14, pp. 74-81. https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.74
8. Davey H. M., Hexley P. Red but not dead? Membranes of stressed Saccharomyces cerevisiae are permeable to propidium iodide // Environmental microbiology, 2011, vol. 13. no. 1, pp. 163-171. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x
9. Frossard A., Hammes F., Gessner M. O. Flow cytometric assessment of bacterial abundance in soils, sediments and sludge // Frontiers in microbiology, 2016, vol. 7, 903 p. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00903
10. Francisco D. E., Mah R. A., Rabin A. C. Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters // Transactions of the American Microscopical Society, 1973, pp. 416-421. https://doi.org/10.2307/3225245
11. Golovchenko A.V., Sannikova Y.V., Dobrovol'skaya T.G., Zvyagintsev D.G. The saprotrophic bacterial complex in the raised peat bogs of western Siberia // Microbiology, 2005, vol. 74, pp. 471-476. https://doi.org/10.1007/s11021-005-0091-y
12. Guava easyCyte™ System User Guide For systems running guavaSoft™ software version 3.1, 0110-8493 Rev B, 2014.
13. Kukharenko O.S., Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Stepanov A.L., Matyshak G.V. The structure of the bacterial heterotrophic block in tundra soils of Yamal Peninsula //Eurasian Soil Science, 2009, vol. 42, pp. 426-431. https://doi.org/10.1134/S1064229309040097
14. 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, no. 6, pp. 236-245. https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.236
15. Khalili B., Weihe C., Kimball S., Schmidt K.T., Martiny J.B. Optimization of a method to quantify soil bacterial abundance by flow cytometry // MSphere, 2019, vol. 4, no. 5, pp. 10-19. https://doi.org/10.1128/mSphere.00435-19
16. Lew S., Glińska-Lewczuk K., Lew M. The effects of environmental parameters on the microbial activity in peat-bog lakes // PLoS One, 2019, vol. 14, no. 10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224441
17. Lysak L.V., Lapygina E.V., Kadulin M.S., Konova I.A. Number, viability, and diversity of the filterable forms of prokaryotes in sphagnous high-moor peat // Biology Bulletin, 2014, vol. 41, pp. 228-232. https://doi.org/10.1134/S1062359014030066

18. 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, no. 7, pp. 961-968. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00767.x
19. Haynes M., Seegers B., Saluk A. Advanced analysis of marine plankton using flow cytometry // Biotechniques, 2016, vol. 60, no. 5, pp. 260. https://doi.org/10.2144/000114418
20. El Mujtar V.A., Chirdo F., Lagares A., Wall L., Tittonell P. Soil bacterial biodiversity characterization by flow cytometry: The bottleneck of cell extraction from soil // Methods in Ecology and Evolution, 2022, vol. 13, no. 7, pp. 1388-1401. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13876
21. McKinnon K. M. Flow cytometry: an overview // Current protocols in immunology. 2018, vol. 120, no. 1, pp. 11-21. https://doi.org/10.1002/cpim.40
22. Parks D. R., Roederer M., Moore W. A. A new "Logicle" display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data // Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2006, vol. 69, no. 6, pp. 541-551. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20258
23. Page S., Burns R.G. Flow cytometry as a means of enumerating bacteria introduced into soil // Soil Biology and Biochemistry, 1991, vol. 23, no. 11, pp. 1025–1028. https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90038-L
24. Robinson J. P. Overview of flow cytometry and microbiology // Current protocols in cytometry, 2018, vol. 84, no. 1, pp. 108-131. https://doi.org/10.1002/cpcy.37
25. 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, pp. 700-708. https://doi.org/10.1134/S0026261719060158
26. Wilkinson M. G. Flow Cytometry in Microbiology // Ireland: Wilkinson Department of Life Sciences, University of Limerick, 2015, 230 p.
27. Zvyagintsev D. G. Methods of soil microbiology and biochemistry. Moscow: MSU, 1991, 304 p.
28. Zubov I.N., Orlov A.S., Selyanina S.B., Zabelina S.A., Ponomareva T.I. Redox potential and acidity of peat are key diagnostic physicochemical properties for the stratigraphic zones of a boreal raised bog // Mires & Peat, 2022, no. 28. https://doi.org/10.19189/MaP.2020.GDC.StA.1987

References

1. Astashkina A.P. *Analiz mikroflory vody i vozdukha: metodicheskie ukazaniya k vypolneniyu laboratornoy raboty po distsiplinam «Mikrobiologiya», «Farmakologiya, biokhimiya, mikrobiologiya» i «Biotekhnologiya»* [Analysis of the

microflora of water and air: methodological guidelines for laboratory work in the disciplines of "Microbiology", "Pharmacology, biochemistry, microbiology" and "Biotechnology"]. Tomsk: TPU Publ., 2015, 25 p.

2. Postovalov A.A., Sukhanova S.F., Kurskaya Y.A. Vyyavlenie faktorov, opredelyayushchikh mikrobiologicheskuyu aktivnost' biotsenoza [Identification of factors determining the microbiological activity of the biocenosis]. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2022, vol. 14, no. 1, pp. 286-302. https://10.12731/2658-6649-2022-14-1-286-302
3. Buesing N., Gessner M.O. 2002. Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles plant litter and epiphytic biofilm. *Aquat. Microb. Ecol*, 2002, vol. 27, pp. 29–36. https://doi.org/10.3354/ame027029
4. Bogdanova O.Y., Golovchenko A.V., Lysak L.V., Glukhova T.V., Zvyagintsev D.G. Viability of bacteria in peatlands. *Eurasian soil science*, 2014, vol. 47, pp. 297-303. https://doi.org/10.1134/S1064229314020033
5. Button D. K., Robertson B. R. Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 4, pp. 1636-1645. https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1636-1645.2001
6. Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Kukharenko O.S., Yakushev A.V., Semenova T.A., Inisheva L.A. The structure of the microbial communities in low-moor and high-moor peat bogs of Tomsk oblast. *Eurasian Soil Sc*, 2012, vol. 45, pp. 273–281. https://doi.org/10.1134/S1064229312030039
7. Danovaro R., Middelboe M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems. *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 2010, vol. 14, pp. 74-81. https://doi.org/10.4319/mave.2010.978-0-9845591-0-7.74
8. Davey H. M., Hexley P. Red but not dead? Membranes of stressed Saccharomyces cerevisiae are permeable to propidium iodide. *Environmental microbiology*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 163-171. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x
9. Frossard A., Hammes F., Gessner M. O. Flow cytometric assessment of bacterial abundance in soils, sediments and sludge. *Frontiers in microbiology*, 2016, vol. 7, 903 p. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00903
10. Francisco D. E., Mah R. A., Rabin A. C. Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1973, pp. 416-421. https://doi.org/10.2307/3225245
11. Golovchenko A.V., Sannikova Y.V., Dobrovol'skaya T.G., Zvyagintsev D.G. The saprotrophic bacterial complex in the raised peat bogs of western Siberia. *Microbiology*, 2005, vol. 74, pp. 471-476. https://doi.org/10.1007/s11021-005-0091-y

12. Guava easyCyte™ System User Guide For systems running guavaSoft™ software version 3.1, 0110-8493 Rev B, 2014.
13. Kukharenko O.S., Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Stepanov A.L., Matyshak G.V. The structure of the bacterial heterotrophic block in tundra soils of Yamal Peninsula. *Eurasian Soil Science*, 2009, vol. 42, pp. 426-431. https://doi.org/10.1134/S1064229309040097
14. 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, no. 6, pp. 236-245. https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.236
15. Khalili B., Weihe C., Kimball S., Schmidt K.T., Martiny J.B. Optimization of a method to quantify soil bacterial abundance by flow cytometry. *MSphere*, 2019, vol. 4, no. 5, pp. 10-19. https://doi.org/10.1128/mSphere.00435-19
16. Lew S., Glińska-Lewczuk K., Lew M. The effects of environmental parameters on the microbial activity in peat-bog lakes. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no. 10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224441
17. Lysak L.V., Lapygina E.V., Kadulin M.S., Konova I.A. Number, viability, and diversity of the filterable forms of prokaryotes in sphagnous high-moor peat. *Biology Bulletin*, 2014, vol. 41, pp. 228-232. https://doi.org/10.1134/S1062359014030066
18. 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, no. 7, pp. 961-968. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00767.x
19. Haynes M., Seegers B., Saluk A. Advanced analysis of marine plankton using flow cytometry. *Biotechniques*, 2016, vol. 60, no. 5, pp. 260. https://doi.org/10.2144/000114418
20. El Mujtar V.A., Chirdo F., Lagares A., Wall L., Tittonell P. Soil bacterial biodiversity characterization by flow cytometry: The bottleneck of cell extraction from soil. *Methods in Ecology and Evolution*, 2022, vol. 13, no. 7, pp. 1388-1401. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13876
21. McKinnon K. M. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*. 2018, vol. 120, no. 1, pp. 11-21. https://doi.org/10.1002/cpim.40
22. Parks D. R., Roederer M., Moore W. A. A new "Logicle" display method avoids deceptive effects of logarithmic scaling for low signals and compensated data. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2006, vol. 69, no. 6, pp. 541-551. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20258
23. Page S., Burns R.G. Flow cytometry as a means of enumerating bacteria introduced into soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1991, vol. 23, no. 11, pp. 1025–1028. https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90038-L

24. Robinson J. P. Overview of flow cytometry and microbiology. *Current protocols in cytometry*, 2018, vol. 84, no. 1, pp. 108-131. https://doi.org/10.1002/cpcy.37
25. 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, pp. 700-708. https://doi.org/10.1134/S0026261719060158
26. Wilkinson M. G. Flow Cytometry in Microbiology. Ireland: Wilkinson Department of Life Sciences. University of Limerick, 2015, 230 p.
27. Zvyagintsev D. G. Methods of soil microbiology and biochemistry. Moscow: MSU, 1991, 304 p.
28. Zubov I.N., Orlov A.S., Selyanina S.B., Zabelina S.A., Ponomareva T.I. Redox potential and acidity of peat are key diagnostic physicochemical properties for the stratigraphic zones of a boreal raised bog. *Mires & Peat*, 2022, no. 28. https://doi.org/10.19189/MaP.2020.GDC.StA.1987

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку статьи для публикации.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors contributed equally to this article.

ДАННЫЕ ОБ АВТОРАХ

Шпанов Дмитрий Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории болотных экосистем
ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лаверова УрО РАН
проспект Никольский, 20, г. Архангельск, 163020, Российская федерация
shpanov.d@yandex.ru

Зубов Иван Николаевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории болотных экосистем
Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени акад. Н.П. Лаверова УрО РАН
проспект Никольский, 20, г. Архангельск, 163020, Российская федерация
zubov.ivan@bk.ru

DATA ABOUT THE AUTHORS

Dmitriy A. Shpanov, Research Assistant, Wetland Ecosystems Laboratory
Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the UrB RAS
20, Nikolsky Ave., Arkhangelsk, 163020, Russian Federation
shpanov.d@yandex.ru

Ivan N. Zubov, PhD in Chemistry, Senior Researcher, Wetland Ecosystems Laboratory
Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the UrB RAS
20, Nikolsky Ave., Arkhangelsk, 163020, Russian Federation
zubov.ivan@bk.ru

Поступила 27.02.2024 Received 27.02.2024
После рецензирования 09.06.2024 Revised 09.06.2024
Принята 21.06.2024 Accepted 21.06.2024