*ISSN 0868-854 (Print); ISSN 2413-5984* (*Online*).
*Algologia. 2021. 31*(*4*): *353–364*
https://doi.org/10.15407/alg31.04.353

# Порівняльний аналіз методів оцінки збереженості культур мікроводоростей *Dunaliella salina* Teodoresco та *Chlorococcum dissectum* Korshikov (*Chlorophyta*) після впливу стрес-факторів

**Чернобай Н.А., Возовик К.Д., Каднікова Н.Г.**

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,*
*вул. Переяславська, 23, Харків 61016, Україна*
nadiiachernobai@gmail.com

Надійшла до редакції 22.08.2021. Після доопрацювання 28.09. 2021. Підписана до друку 25.10.2021. Опублікована 22.12.2021

**Реферат**. Досліджена та проаналізована можливість використання різноманітних методів визначення життєздатності культур мікроводоростей *Dunaliella salina* та *Chlorococcum dissectum* до та після впливу пошкоджуючих факторів. Встановлено, що підбір оптимального методу повинен здійснюватися для кожної культури індивідуально. Для інтегральної оцінки проліферативної та метаболічної активності клітин мікроводоростей може використовуватися Alamar Blue-тест та здатність до зростання на рідких поживних середовищах. Використання чашкового методу Коха, 3-(4,5-диметілтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум броміду (МТТ-тест) і трифеніл-2,3,5-тетразолій хлориду (ТТХ) можливе лише для мікроводорості *C. dissectum.* Вітальне забарвлення трипановим синім виявилося некоректним для обох культур.

К л ю ч о в і  с л о в а : життєздатність, мікроводорості, *Chlorococcum dissectum*, *Dunaliella salina*, Alamar Blue, МТТ-тест, ТТХ, трипановий синій

## Вступ

Основними показниками, які визначають життєздатність будь якої клітини, є здатність до відтворення, дихання тощо, але специфічність протікання цих процесів залежить від певного типу клітин. Мікроводорості завдяки своїй здатності до існування у різноманітних умовах набули широкого спектру адаптаційних механізмів і унікальних біологічних властивостей, що дозволяє їх використання в якості модельних об’єктів у наукових дослідженнях та багатьох галузях біотехнології (Yuana et al., 2002; Chowdhury et al., 2016; Borovkov et al., 2019). Широке наукове та практичне використання мікроводоростей, зокрема *Dunaliella salina* Teodoresco, 1905 та *Chlorococcum dissectum* Korshikov, 1953*,* потребує підбору ефективних методів інтегральної оцінки їхньої збереженості.

© Чернобай Н.А., Возовик К.Д., Каднікова Н.Г., 2021

Поширеними методами для визначення життєздатності рослинних клітин після впливу пошкоджуючих чинників є вітальне забарвлення трипановим синім та оцінка приросту біомаси впродовж культивування шляхом кількісного підрахунку концентрації клітин (кл/мл) у камері Горяєва (Fernández et al., 2018). Однак забарвлення трипановим синім вказує лише на стан плазматичної мембрани, тому результати використання методики не обов'язково співпадають з показниками життєздатності. Оцінка життєздатності клітин за приростом біомаси не дозволяє отримати комплексну характеристику їхнього стану після впливу стресових факторів.

Життєздатність та рівень збереженості клітин, схильних до колонієутворення, можна оцінити за здатністю культури до росту на агаризованому середовищі (чашковий метод Коха) (Shimomura et al., 2006).

Метаболічну активність клітин досліджують за інтенсивністю окремих фізіологічних процесів. Одним із можливих способів є оцінка ферментів дегідрогеназ за допомогою тетразолієвих барвників (Stockert et al., 2018). Низький окислювально-відновлювальний потенціал цих сполук забезпечує перехоплення ними іонів $H^+$, які переносяться нікотинамідаденін-динуклеотидом у процесі клітинного дихання. Це сприяє відновленню тетразолієвих солей та їхнього переходу до водонерозчинної форми – формазану. Реакція відбувається у цитоплазмі за рахунок діяльності цитоплазматичних дегідрогеназ та в мітохондріях (Ryzhik, 2013). Інтенсивність накопичення формазану дозоляє оцінити метаболічну активність клітин (МТТ- або ТТХ-тест). Наразі вони широко використовуються для визначення фізіологічного стану як тваринних, так і рослинних клітин (Petrenko et al., 2005; Ryzhik, 2013; Anikina et al., 2014; Bonnier et al., 2015). Також відомі дослідження, зроблені на макроводоростях з тонкопластинчатою будовою (Lu et al., 2006). Однак на мікроводоростях цей метод не використовувався.

Як додатковий спосіб оцінки метаболічної активності клітин, індикатора їхньої життєздатності та проліферації широко використовується Alamar Blue-тест (АВ-тест). Суть його полягає у накопиченні відновленої форми індикатору, кількість якого пропорційна активності окислювально-відновлювальних ферментів, які збільшуються у ході проліферації (Ahmed et al., 1994; Petrenko et al., 2005).

У літературі досить мало відомостей про використання зазначених методів оцінки збереженості рослинних клітин (Byth et al., 2001; Lu et al., 2006; Schrader, 2006; Zidarova, Pouneva, 2006), в основному дослідження проводилися на тваринах (Petrenko et al., 2005; Bonnier et al., 2015; Manlong et al., 2015).

Мета роботи – перевірка ефективності та підбір оптимального методу оцінки збереженості та метаболічної активності клітин мікроводоростей *Dunaliella salina* та *Chlorococcum dissectum*.

**Матеріали та методи**

Культури мікроводоростей *C. dissectum* та *D. salina* були отримані з колекції кафедри ботаніки Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

*Умови культивування мікроводостей*

Культивування суспензійних культур об'ємом 15 мл здійснювалося до початку стаціонарної фази росту в колбах Ерленмейера об'ємом 50 або 100 мл (*C. dissectum*) та в культуральних флаконах (TPP, Switzerland) об'ємом 40 мл (*D. salina*) за температури 25 ± 2 °C і цілодобовому освітленні білим флуоресцентним світлом 52,84 мкмоль фотонів $m^{-2}$ $s^{-1}$ (3 klx) без аерації (Tafreshi, Shariati, 2009; Aravantinou, Manariotis, 2016).

*Chlorococcum dissectum* вирощували на рідкому поживному середовищі BG-11 (Al-Rikabey, Al-Mayah, 2018). Для культивування *D. salina* використовували середовище Ramaraj з 4 М концентрацією хлориду натрію (Ramaraj, Niran, 2013). Контроль накопичення біомаси мікроводоростей здійснювали шляхом підрахунку кількості клітин у камері Горяєва.

*Оцінка збереженості та життєздатності клітин*

Життєздатність клітин *C. dissectum* визначали за кількістю колоніє-утворюючих одиниць (КУО) протягом 10 днів при температурі 25 °C і цілодобовому освітленні на агаризованому середовищі BG-11 (*Handbook…*, 1995). Збереженість клітин *D. salina* оцінювали, виходячи з морфологічних властивостей: цілісності клітин, структури хлоропласту, рухливості, наявності або втраті джгутиків. Додатково здійснювали культивування зразків *D. salina* на рідкому поживному середовищі.

*AB- та MTT-тести*

Для проведення MTT- та AB-тесту використовували культури в таких концентраціях: *D. salina* ($153 \times 10^6$ кл/мл; $102 \times 10^6$ кл/мл; $76{,}5 \times 10^6$ кл/мл; $51 \times 10^6$ кл/мл): *C. dissectum* ($118 \times 10^6$ кл/мл, $84{,}6 \times 10^6$ кл/мл, $45{,}8 \times 10^6$ кл/мл, $19 \times 10^6$ кл/мл, $10{,}8 \times 10^6$ кл/мл).

Культури об'ємом 200 мкл поміщали у стерильні 96-лункові планшети (НИИмедполимер, Росія). До кожної проби додавали по 20 мкл 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум броміду (MTT) або 20 мкл резазурину (AB). Зразки інкубували протягом 4 год (MTT-тест) і 20 год (AB-тест) у термостаті без доступу світла за температури 28 °C. Після інкубації в культурах з додаванням MTT відбирали надосад (по 200 мкл) і додавали по 100 мкл 100% ДМСО для екстракції утвореного формазану (Rampersad, 2012; Prilepskiy, 2019). Оптичну щільність усіх зразків вимірювали за допомогою планшетного спектрофотометра *Tecan GENios* (*Tecan Inc*, Австралія) на довжині хвилі 550 нм. Отримані дані обробляли за допомогою програми *XFLUOR4 v.4.50.*

*Забарвлення ТТХ*

До 0,5 мл культури клітин додавали 0,1 мл 0,02% розчину ТТХ (кінцева концентрація ТТХ у розчині 0,075%). Зразок поміщали в термостат за температури 22 °С та відсутності світла на 16 год для утворення кристалів формазану. По закінченні вказаного часу наявність рожевих кристалів оцінювали за допомогою світлового мікроскопа «Ломо Микмед-2». Присутність забарвлення вказувала на життєздатність клітин (Del Egido et al., 2017).

*Забарвлення трипановим синім*

До 1 мл суспензії клітин додавали 0,1 мл 0,4% розчину трипанового синього (розчин барвника попередньо готували на відповідних рідких живильних середовищах). Інкубували протягом 10 хв в умовах прямого освітлення. Кількість забарвлених клітин підраховували під світловим мікроскопом Ломо Микмед-2 (Prilepskyi et al., 2019).

*Отримання інактивованих клітин*

Інактивовані (нежиттєздатні) клітини культур мікроводоростей отримували шляхом циклічних змін температури у діапазоні від 25 ±2 °С до -196 °С (занурювання зразків у рідкий азот з подальшим відігріванням при 30 °С). Загибель клітин обох культур мікроводоростей відбувалася після 5-разової зміни температури.

Статистичну обробку здійснювали з використанням програми PAST 3 та U-критерію Манна-Уітні.

**Результати та обговорення**

Нами було проведено оцінку різних методів визначення життєздатності клітин мікроводоростей *C. dissectum* та *D. salina.*

*Культивування на рідких поживних середовищах та чашковий метод Коха*

Культивування *C. dissectum* та *D. salina* показало, що мікроводорості здатні до успішного росту при культивуванні на рідких поживних середовищах (рис. 1).

Завдяки здатності мікроводорості *C. dissectum* до колонієутворення на щільних поживних середовищах та для оцінки збереженості культури можна застосовувати культивування не тільки на рідкому, а й на агаризованому середовищі (див. таблицю).

Наведені способи можна з успіхом використовувати в біотехнологічних дослідженнях для визначення здатності клітин до росту й оцінки їхньої життєздатності після кріоконсервування та впливу інших пошкоджуючих факторів.

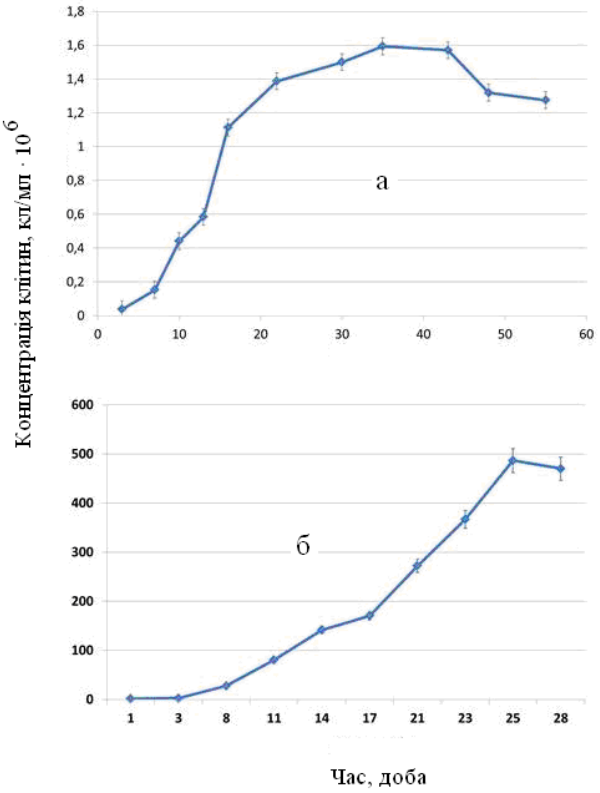



Рис. 1. Криві росту *Dunaliella salina* (*а*) та *Chlorococcum dissectum* (*б*) на рідких поживних середовищах

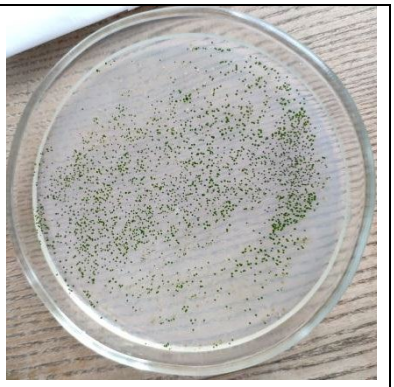
Визначення життєздатності клітин за допомогою культивування на рідких та твердих поживних середовищах − досить тривалий процес, який займає від одного до кількох тижнів. Тому нами були досліджені експрес-методи оцінки збереженості культур.

*АВ- та МТТ-тести*

Визначення життєздатності культур *C. dissectum* та *D. salina* шляхом аналізу метаболічної активності клітин показало успішність використання АВ-тесту. Чітко простежується підвищення умовних одиниць флуоресценції (УОФ) у зразках з інтактними клітинами на відміну від інактивованих, що свідчить про придатність методики для оцінки показників життєздатності даних видів мікроводоростей (рис. 2).

Використання МТТ-тесту для оцінки життєздатності клітин мікроводорості *C. dissectum* дозволило встановити кореляцію між інтенсивністю забарвлення та кількістю життєздатних клітин у зразку (рис. 3).

Таблиця. **Визначення життєздатності клітин *Chlorococcum dissectum* за здатністю до колонієутворення (чашковий метод Коха) у зразках з інтактною та інактивованою культурою на 10 добу спостереження**

| Зразок | $\times 10^8$ КУО/мл | |
|---|---|---|
| Інтактна культура | 0,70 ± 0,03 |  |
| Інактивована культура | 0 | |

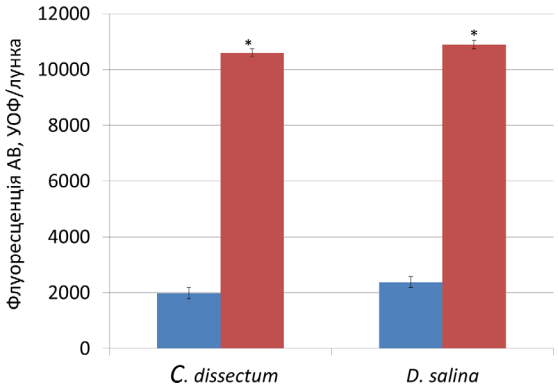



Рис. 2. Показники флуоресценції в культурах мікроводоростей *Chlorococcum dissectum* та *Dunaliella salina* за тестом відновлення Alamar Blue: ■ – інактивовані клітини, ■ – інтактні. * – Різниця статистично значуща порівняно з інактивованими зразками ($p < 0,01$)

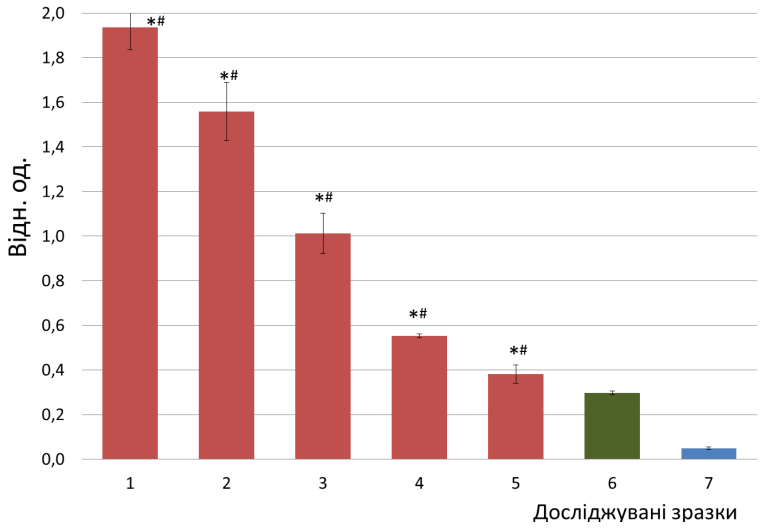



Рис. 3. Оптична щільність досліджуваних зразків за МТТ-тестом: 1–5 – *Chlorococcum dissectum* з різною концентрацією клітин: 118 × $10^6$ кл/мл, 84,6 × $10^6$ кл/мл, 45,8 × $10^6$ кл/мл, 19 × $10^6$ кл/мл та 10,8 × $10^6$ кл/мл відповідно; 6 – інактивовані клітини; 7 – середовище культивування без додавання клітин. * – Різниця статистично значуща порівняно з інактивованими зразками ($p < 0,05$); # – порівняно з середовищем культивування без клітин ($p < 0,01$)

Для клітин *D. salina* МТТ-тест виявився нерезультативним і не дозволив встановити кореляції між живими та мертвими клітинами. Ймовірно, що під час інкубації барвник вступає в реакцію з надмірною кількістю пігментів у культурі, які синтезуються у відповідь на високу концентрацію хлориду натрію в середовищі, і спектрофотометрія дає хибні результати (Chernobai et al., 2019). Цей метод потребує додаткових досліджень.

Відтак для лабораторної практики у якості додаткового методу визначення життєздатності культур *C. dissectum* та *D. salina* можливе використання АВ-тесту, тоді як МТТ-тест може застосовуватися тільки для культури *C. dissectum*.

*Забарвлення ТТХ*

Використання ТТХ для визначення життєздатності клітин *C. dissectum* показало відновлення барвника до помаранчевих кристалів формазана в інтактній культурі, тоді як в інактивованій забарвлення не відбувалося (рис. 4).

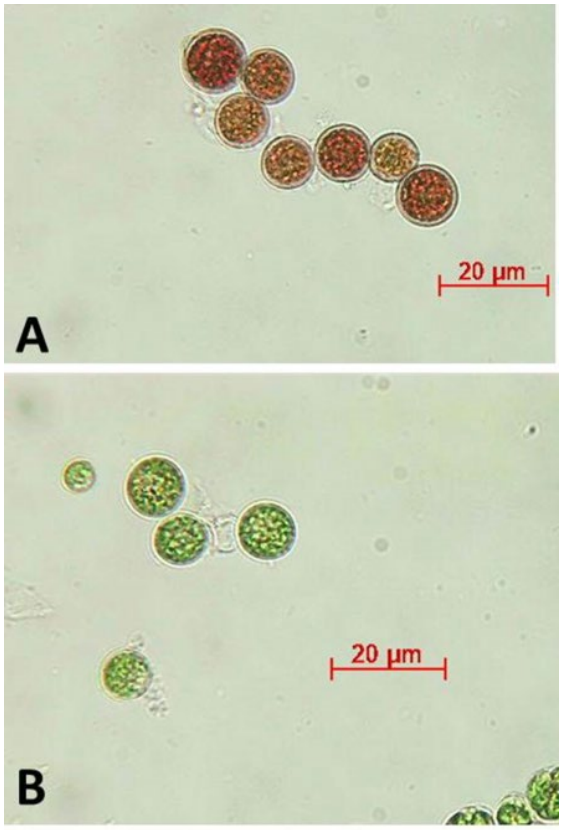



Рис. 4. Забарвлення *Chlorococcum dissectum* за допомогою ТТХ: *А* – інтактні клітини, *В* – інактивовані

Забарвлення зразків *D. salina* за допомогою ТТХ виявилося не інформативним, інтактні клітини під мікроскопом мали такий самий колір, як і інактивовані (рис. 5). Вірогідно, це пов'язано з пігментним складом клітин мікроводорості *D. salina*, оскільки відомо, що вони здатні до накопичення значної кількості каротиноїдів, які під мікроскопом мають помаранчево-коричневе забарвлення (Chernobai et al., 2019).

*Забарвлення трипановим синім*

Незважаючи на те, що даний метод користується великим попитом для швидкої оцінки збереженості клітин після кріоконсервування та дії інших пошкоджуючих факторів, забарвлення трипановим синім не виявилося інформативним для використання на культурах *C. dissectum* та *D. salina.* Причина полягає в особливості їхньої морфології та різному просторовому розміщенні клітин у краплі на предметному скельці Спостерігається забарвлення лише оболонки інактивованих клітин *C. dissectum* та *D. salina*, що не дозволяє повністю оцінити їхній стан (рис. 6).

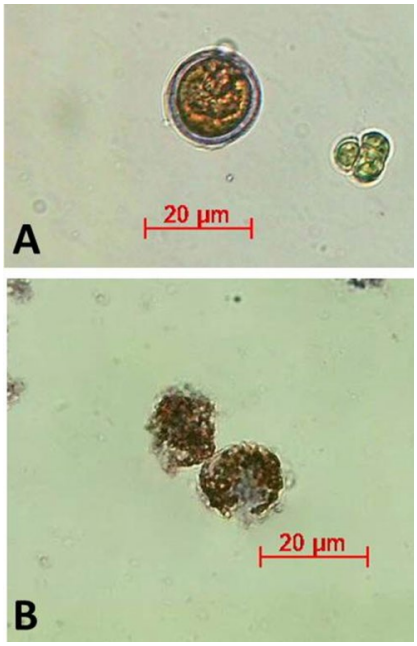



Рис. 5. Забарвлення *Dunaliella salina* за допомогою ТТХ: *A* – інтактні клітини, *B* – інактивовані

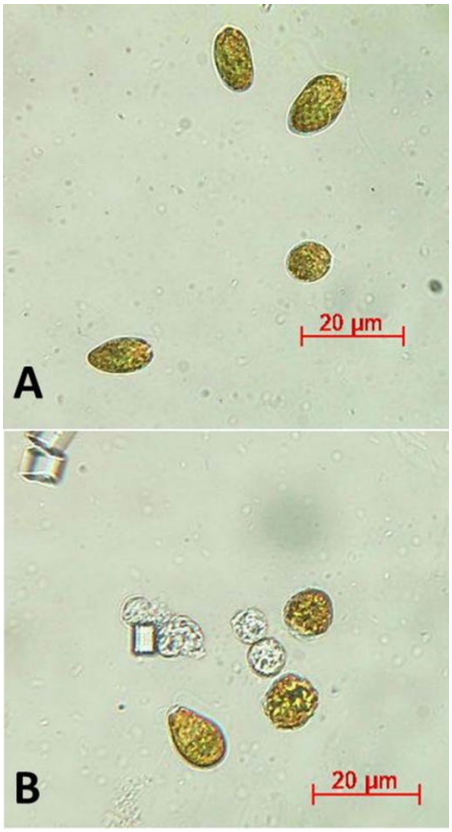



Рис. 6. Забарвлення інактивованих клітин *Chlorococcum dissectum* (*A*) і *Dunaliella salina* (*B*) після додавання трипанового синього

**Висновки**

Під час проведення експериментів по вибору ефективного методу визначення життєздатності культур мікроводоростей *Chlorococcum dissectum* та *Dunaliella salina* було показано, що успішність результату залежить від конкретного виду мікроводорості.

Для обох досліджених культур у якості методів оцінки збереженості клітин доцільним було використання АВ-тесту та культивування на рідких поживних середовищах. Використання чашкового методу Коха, МТТ-тесту та забарвлення ТТХ виявилося ефективним лише для мікроводорості *C. dissectum.* Методика забарвлення трипановим синім була не інформативною для обох культур через особливості проникнення барвника до клітин.

**Список літератури**

Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to 3H-thymidine incorporation assay. *J. Immunol*. *Meth*. 2(170): 211–224.

Al-Rikabey M.N., Al-Mayah A.M. 2018. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in BG-11 Media Using Taguchi Method. *J. Adv Res. Dynamic. Control Syst*. 10(7): 19–30.

Anikina L., Puchov S., Dubrovskaya S., Afanasyeva S., Klochkov S. 2014. Comparative determination of cell viability using MTT and resazurin. *Fund. Res*. 7(12): 1423–1427.

Aravantinou A.F., Manariotis I.D. 2016. Effect of operating conditions on *Chlorococcum* sp. growth and lipid production. *J. Environ. Chem. Eng.* 1(4): 1217–1223. https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.01.028

Bonnier F., Keating M.E., Wróbel T.P., Majzner K., Baranska M., Garcia-Munoz A., Blanco A., Byrne H.J. 2015. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol. in Vitro*. 29: 124–131. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014

Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Avsiyan A.L., Memetshaeva O.A., Lelekov A.S., Novikova T.M., Kovalevsky A.O. 2019. Production characteristics of *Dunaliella salina* at two-phase pilot cultivation. *Turk. J. Fisher. Aquat. Sci*. 5(20): 401–408. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_08

Byth H., Mcunu B., Dubery I. 2001. Assessment of a simple, non-toxic Alamar blue cell survival assay to monitor tomato cell viability. *Phytochem. Anal*. 5(12): 340–348. https://doi.org/10.1002/pca.595

Chernobai N., Kadnikova N., Kovalenko I. 2019. The role of cold adaptation in cryopreservation of *Dunaliella salina* Teod. microalgae. *Advan. Biol. Earth Sci*. 4(2): 119–127.

Chowdhury M., Sheikh A., Miskat S., Mala K. 2016. Triacylglycerol profile of a microalga *Chlorococcum* sp. as a potential biofuel feedstock. *Bangladesh Acad. Sci*. 2(40): 147–153. https://doi.org/10.3329/jbas.v40i2.30770

Del Egido L.L., Navarro-Miró D., Martinez-Heredia V., Toorop P.E., Iannetta P. 2017. A spectrophotometric assay for robust viability testing of seed batches using 2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride: using *Hordeum vulgare* L. as a model. *Front. Plant Sci.* 8: 747. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00747

Fernández C., Hervás D., Rivas-Sendra A., Marín M., Seguí-Simarro J. 2018. Comparison of six diferent methods to calculate cell densities. *Plant Methods*. 14(1): 1–15. https://doi.org/10.1186/s13007-018-0297-4

*Handbook for practical classes in microbiology*. 1995. Ed. N.S. Egorova. Moscow: Moscow State Univ. Press. 224 c.

Lu I.-F., Ming-Shiuan S., Tse-Min L. 2006. Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata*. *Mar. Biol*. 1: 1–15.

Petrenko S.A., Gorokhova N.A., Sandomirsky B.P., Petrenko A.Y. 2005. Determination of the metabolic activity of freshly isolated and cryopreserved human embryonic liver cells using Alamar Blue-test. *Probl. Cryobiol. Cryomed*. 4(15): 600–606.

Prilepsky A.Yu, Drozdov A.S., Bogatyrev V.A., Staroverov S.A. 2019. *Methods of working with cell cultures and determination of toxicity of nanomaterials.* St. Petersburg: ITMO Univ. 43 p.

Ramaraj S., Niran J. 2013. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella strains*. *Int. J. Curr. Sci*. 5: 67–73.

Rampersad S.N. 2012. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 12: 12347–12360. https://doi.org/10.3390/s120912347

Ryzhik I.V. 2013. Assessment of metabolic activity of fucus algae by tetrazolium method. *Algologia.* 1(23): 10–18. https://doi.org/10.15407/alg23.01.010

Schrader K., Harries M. 2006. A rapid bioassay for bactericides against the catfish pathogens *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium columnare*. *Aquacult. Res*. 37: 928–937. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01514.x

Shimomura Y., Ohno R., Kawai F., Kimbara K. 2006. Method for Assessment of Viability and Morphological Changes of Bacteria in the Early Stage of Colony Formation on a Simulated Natural Environment. *Appl. Environ. Microbiol*. 72(7): 5037–5042. https://doi.org/10.1128/AEM.00106-06

Stockert J., Horobin R., Colombo L., Blázquez-Castro A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 3(120): 159–167. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005

Tafreshi A., Shariati M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol*. 107: 14–35. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

Xu M., McCanna D.J., Sivak J.C. 2015. Use of the viability reagent Presto Blue in comparison with Alamar Blue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J. Pharm. Toxicol. Methods*. 71: 1–7. https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.003

Yuana J., Chenb F., Liua X., Zhen X. 2002. Carotenoid composition in the green microalga *Chlorococcum*. *Food Chem*. 76: 319–325. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00279-5

Zidarova R., Pouneva I. 2006. Physiological and biochemical characterization of Antarctic isolate *Chloricystis minor* during oxidative stress at different temperatures and light intensities. *Gen. Appl. Plant. Physiol.* 32(1–2): 109–117.

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Chernobai N.A., Vozovik K.D., Kadnikova N.G. 2021. **Comparative analysis of methods for assessing the safety of *Dunaliella salina* Teodoresco and *Chlorococcum dissectum* Korshikov (*Chlorophyta*) microalgae cultures after exposure to stress factors**. *Algologia*. 31(4): 353–364

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine,
23 Pereyaslavska Str., Kharkiv 61016, Ukraine

The possibility of using various methods for determining the viability of cultures of microalgae *Dunaliella salina* and *Chlorococcum dissectum* before and after freezing-warming was

investigated and analyzed. It has been established that the selection of an effective method should be carried out individually for each culture. For an integral assessment of the proliferative and metabolic activity of cells of both species of the studied microalgae, Alamar Blue-test and the ability to grow on liquid nutrient media can be used. The use of the Koch plate method, MTT-test and TTC staining is possible only for the microalga *C. dissectum*. Vital staining with trypan blue was found to be incorrect.

K e y w o r d s : viability, microalgae, *Chlorococcum dissectum*, *Dunaliella salina*, Alamar Blue, MTT-test, TTC, trypan blue