

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

DOI: 10.26565/2075-5457-2022-39-2
УДК: 57.086.13:582.232**Вплив умов низькотемпературного зберігання на життєздатність
мікроводорості *Chlorococcum dissectum*
К.Д. Возовик, Н.О. Шевченко**

Chlorococcum dissectum Korshikov, 1953 – одноклітинна прісноводна зелена водорість, здатна до накопичення та депонування ліпідів у клітині. Незалежно від походження та таксономічної класифікації, біотехнологічно важливі мікроорганізми та клітинні лінії є біологічними ресурсами, які використовують для виробництва різних продуктів. Метою роботи було визначення впливу режимів низькотемпературного зберігання на її життєздатність. Використовували такі температури: -18°C , -40°C , -70°C , -196°C . Для забезпечення -18°C використовували звичайний побутовий морозильник. Охолодження до -40°C та -70°C проводили з неконтрольованими швидкостями охолодження шляхом вміщення кріопробірок безпосередньо у морозильні камери або з використанням контейнера для заморожування Mr. Frosty, який забезпечує швидкість зниження температури 1 град/хв. Заморожування до -196°C відбувалося шляхом прямого занурення кріопробірок у рідкий азот та за умов двоетапного охолодження зі швидкістю 1 та 20 град/хв. до -40°C з подальшим перенесенням у кріосховище. Життєздатність *C. dissectum* визначали шляхом підрахунку колоній, які сформувалися на агаризованому поживному середовищі BG-11. Встановлено, що внаслідок заморожування до -18°C та зберігання протягом двох діб клітини повністю втрачали свою життєздатність. Кріоконсервування до -196°C за усіх досліджених варіантів та неконтрольована швидкість охолодження до -40°C та -70°C , а також подальше зберігання таких зразків за цих температур призводило до значної або повної втрати життєздатності. Охолодження у контейнері для заморожування Mr. Frosty до -40°C та -70°C не впливало на здатність клітин до колонієутворення, при цьому, зберігання *C. dissectum* за температури -40°C не приводило до значної втрати життєздатності протягом усього терміну дослідження, а за -70°C зовсім не змінювало цього показника. Отримані результати показали, що для середньострокового та довготривалого зберігання суспензійної культури *C. dissectum* перспективним є контрольоване охолодження та використання морозильних камер з температурою -40°C та -70°C відповідно. Для підвищення життєздатності зразків після охолодження до температури рідкого азоту необхідно розробити режими кріоконсервування з використанням кріопротекторів.

Ключові слова: мікроводорості, *C. dissectum*, життєздатність, низькотемпературне зберігання, кріоконсервування.

Цитування: Возовик К.Д., Шевченко Н.О. Вплив умов низькотемпературного зберігання на життєздатність мікроводорості *Chlorococcum dissectum*. Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Біологія», 2022, 39, 12–19. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2022-39-2>

Про авторів:

К.Д. Возовик – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, k.vozovik@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9743-001X>

Н.О. Шевченко – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61015, shevchenko_nadyusha@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-6794-1444>

Подано до редакції: 02.11.2022 / Прорецензовано: 05.11.2022 / Прийнято до друку: 07.12.2022

Вступ

Біотехнологія, заснована на функціональних можливостях мікроорганізмів, має величезне значення для світової економіки. Існують численні продукти, які сприяють комерційному успіху практично всіх основних виробничих секторів, включаючи сільське господарство, біоремедіацію, біопаливо, їжу, напої, текстиль та фармацевтику (McWilliams, 2015). Наразі лише невелика частка мікробного біорізноманіття досліджена на предмет його комерційного потенціалу, причому більшість продуктів і послуг отримують з відносно невеликої кількості об'єктів. Мікроводорості практично не використовуються з точки зору біотехнологій, але зростає кількість компаній, які вирощують їх для виробництва пігментів, продуктів харчування, харчових добавок, косметики та космецевтики з комерційною метою. Крім того, аквакультура, зокрема вирощування риби та молюсків на ранніх стадіях розвитку, залежить від харчування високоякісними кормами на основі водоростей. Висока

продуктивність мікроводоростей, порівняно з наземними культурами, стимулювала великий науковий та комерційний інтерес до них, як джерела відновлювальних природних ресурсів (Karooge et al., 2019). Існує два види біопалива – біодизель та біоетанол, для виробництва яких використовують олійні та цукрові культури відповідно, у той час як мікроводорості є єдиною платформою, оскільки синтезують обидва біологічних компоненти (крохмаль і ліпіди) (Rehman, Anal, 2019). *C. dissectum* родини *Chlorococcaceae* – одноклітинна прісноводна зелена водорість, здатна до потенційного накопичення та депонування ліпідів у клітини (Hasan et al., 2016). Незалежно від походження та таксономічної класифікації, біотехнологічно важливі мікроорганізми та клітинні лінії є біологічними ресурсами, які використовують для виробництва різних продуктів. У промисловості, яка базується на виробництві водоростей, безпека основних культур, а також їхня функціональність (тобто здатність синтезувати метаболіти, які мають комерційну цінність) – це першочергове значення. Підтримання культури мікроводоростей у життєздатному стані за стандартних умов культивування займає багато часу. Тому дослідники зацікавлені у розвитку технологій, які передбачають використання низьких температур, зокрема кріоконсервування. При цьому культури зберігають здатність до відновлення функцій росту та розмноження, захищені від генетичного дрейфу, забруднення, не потребують фінансових витрат на довготривале обслуговування (Abreu et al., 2012). Якщо довгострокове збереження зразків призводить до порушення фізичної, генетичної та функціональної стабільності, то під загрозу стає будь-яке їхнє використання з комерційною метою. Існує декілька основних підходів для підтримки основних характеристик вихідної культури. Звичайний серійний перенос, який найчастіше використовується в режимі культивування та викликає сповільнення метаболічної активності; зберігання у дегідратованому вигляді при кімнатній температурі або в холодильнику при 4°C; сублімаційна сушка або ліофілізація; кріоконсервування, при якому температура навколишнього середовища може варіювати від –40 до –196°C (Kirsop, Doyle, 1991).

Більшість науковців центру біологічних ресурсів (BRC), до якого входять представники 38 країн, вважають кріоконсервування найоптимальнішим методом довготривалого зберігання культур. У випадку еукаріотичних мікроводоростей не спостерігалось значного зниження життєздатності протягом 22 років низькотемпературного зберігання ряду таксонів (Hipkin et al., 2014). Крім того, було продемонстровано здатність клітин, відновлених після кріосховища, синтезувати метаболіти, які мають біотехнологічну цінність (Hipkin et al., 2014). Хоча при кріогенних температурах припиняється більшість біологічних функцій, варто зазначити, що при тривалому зберіганні можуть виникати деякі хімічні зміни внаслідок утворення вільних радикалів, іонізуючого випромінювання, результатом чого є пошкодження нуклеїнових кислот, а отже відбувається вплив на генетичну стабільність (Day, Fleck, 2015). Проте з практичної точки зору вважається, що життєздатність фактично не залежить від тривалості зберігання протягом десятиліть, якщо не сотень років, а період напіврозпаду кріоконсервованого матеріалу оцінюється в понад 3000 років (Walters et al., 2004). Більшість бактерій можна успішно кріоконсервувати, зберігаючи у морозильній камері за температури –70°C (Ananyina et al., 2020). Ця методика також була успішно використана для ціанобактерій, але не застосовувалася для більш складних еукаріотичних водоростей.

Метою даної роботи було проведення досліджень щодо визначення впливу різних режимів низькотемпературного зберігання на життєздатність *C. dissectum*.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були мікроводорості *C. dissectum*, які були отримані з колекції кафедри ботаніки Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Культивування суспензійної культури здійснювали на рідкому поживному середовищі BG-11 (Al-Rikabeu, Al-Mayah, 2018; Rehman, Anal, 2019) до початку стаціонарної фази росту в колбах Ерленмейера об'ємом 50 мл за температури 25±2°C і цілодобовому освітленні білим флуоресцентним світлом 52,84 мкмоль фотонів m⁻² s⁻¹ (3 klx) без додаткової аерації (Aravantinou, Manariotis, 2016).

Контроль накопичення біомаси здійснювали шляхом підрахунку кількості клітин у камері Горяєва.

Для концентрування мікроводоростей перед дослідженням впливу низькотемпературного зберігання суспензію центрифугували протягом 3 хв., за 3000 об/хв. до 10⁶ кл/мл та розливали у 1,8 мл кріопробірки (Starlab, Україна). Використовували наступні температури: –18, –40, –70, –196°C.

Для забезпечення -18°C використовували звичайний побутовий морозильник. Охолодження до -40 і -70°C , проводили з неконтрольованими швидкостями охолодження шляхом вміщення кріопробірок безпосередньо у морозильні камери та з використанням контейнера для заморожування Mr. Frosty (TermoFisher Scientific, США), який при дотриманні інструкції експлуатації забезпечує швидкість зниження температури 1 град/хв. Заморожування до -196°C відбувалося шляхом прямого занурення кріопробірок зі зразками у рідкий азот та за умов двоетапного охолодження зі швидкістю 1 та 20 град/хв. до -40°C за допомогою програмного заморожувача ЗП-10 (СКТБ з ОП, Україна) з наступним перенесенням у кріосховище. Відігрів зразків після низькотемпературного зберігання проводили зануренням у водяну баню з температурою 40°C . Контролем були клітини мікроводоростей до зберігання.

Життєздатність *C. dissectum* визначали шляхом підрахунку колоній, які сформувалися на агаризованому поживному середовищі BG-11 протягом 10 днів за температури 25°C і цілодобовому освітленні (Chernobai et al., 2021).

Усі дослідження проводили у шестикратній повторності. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми Past V.3.15 (Університет м. Осло, Норвегія). Визначали середнє значення та стандартне відхилення ($M \pm \sigma$). Значущість різниці між показниками оцінювали за критерієм Тьюкі. Різницю між вибірками вважали значущою при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Для визначення впливу процесу охолодження на культуру клітин необхідно було дослідити життєздатність мікроводорості після заморожування до температур зберігання з використанням різних режимів. Встановлено, що внаслідок заморожування *C. dissectum* до -18°C та зберігання протягом двох діб культура повністю втрачала свою життєздатність. Кріоконсервування до температури рідкого азоту за усіх варіантів дослідження значуще змінювало здатність клітин до утворення колоній (величини цього показника складала від 0,71 до 0,2 КУО $\times 10^6$ /мл). Охолодження зразків до -40 та -70°C за неконтрольованих умов зниження температури призводило до втрати показника життєздатності втричі – 4,1 проти 13,5 КУО $\times 10^6$ /мл. Охолодження у контейнері для заморожування Mr. Frosty до обох зазначених температур не змінювало величини життєздатності клітин, порівняно з контрольним значенням, яке складало від 11,5 до 13,5 КУО $\times 10^6$ /мл (рис. 1).

На рис. 2 показано вплив режиму охолодження та термінів зберігання за -40°C на життєздатність *C. dissectum*. Встановлено, що уже через 10 діб зберігання за умов неконтрольованого режиму охолодження до температури морозильної камери значуще знижувалася життєздатність мікроводорості з 13,5 до 2 КУО $\times 10^6$ /мл. Подовження терміну до 20 діб значуще не змінювало величини зазначеного показника, порівняно з попереднім терміном, та становило 1,6 КУО $\times 10^6$ /мл. Через 30 діб майже усі клітини втратили свою життєздатність (рис. 2).

За умов контрольованого охолодження *C. dissectum* не втрачав здатності до росту протягом усього терміну дослідження, хоча на 20 добу спостерігалось значуще зниження кількості життєздатних зразків порівняно з контролем (6,7 КУО $\times 10^6$ /мл). Слід відзначити, що подовження термінів зберігання до 30 та 90 діб призводило до додаткового зменшення кількості утворених колоній, величина дослідженого показника становила 4,7 та 3 КУО $\times 10^6$ /мл відповідно (рис. 2).

На рис. 3 показано вплив режиму охолодження та зберігання за -70°C на життєздатність *C. dissectum*. Показано, що через 10 діб зберігання за умов неконтрольованого режиму охолодження до температури морозильної камери його життєздатність знижувалася майже у чотири рази по відношенню до контрольних значень та становила 3,1 порівняно з 13,3 КУО $\times 10^6$ /мл. Подовження термінів зберігання призводило до додаткового зменшення кількості утворених колоній, а саме 1,4 на 20-ту добу спостереження, 0,6 на 30-ту та 0,3 на 90-ту (рис. 3).

Встановлено, що охолодження зразків у контейнері для заморожування до -70°C не змінювало показника їхньої життєздатності протягом досліджених термінів зберігання. Здатність клітин до колонієутворення становила 9,5–13,3 КУО $\times 10^6$ /мл (рис. 3).

Традиційне двоетапне кріоконсервування залишається методом вибору для збереження життєздатності мікроводоростей і ціанобактерій. Існує оптимальна швидкість охолодження, яка мінімізує утворення летального внутрішньоклітинного льоду (виникає при швидкому охолодженні) та надмірну осмотичну дегідратацію, що може бути причиною хімічного пошкодження внаслідок збільшення концентрації внутрішньоклітинних розчинених речовин або руйнування внутрішньоклітинних органелів (відбувається в результаті надмірно повільних швидкостей

охлаждения) (Day, Harding, 2008). Для багатьох таксонів водоростей оптимальним режимом є зниження температури 1°C/хв до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот (Day, Brand, 2005).

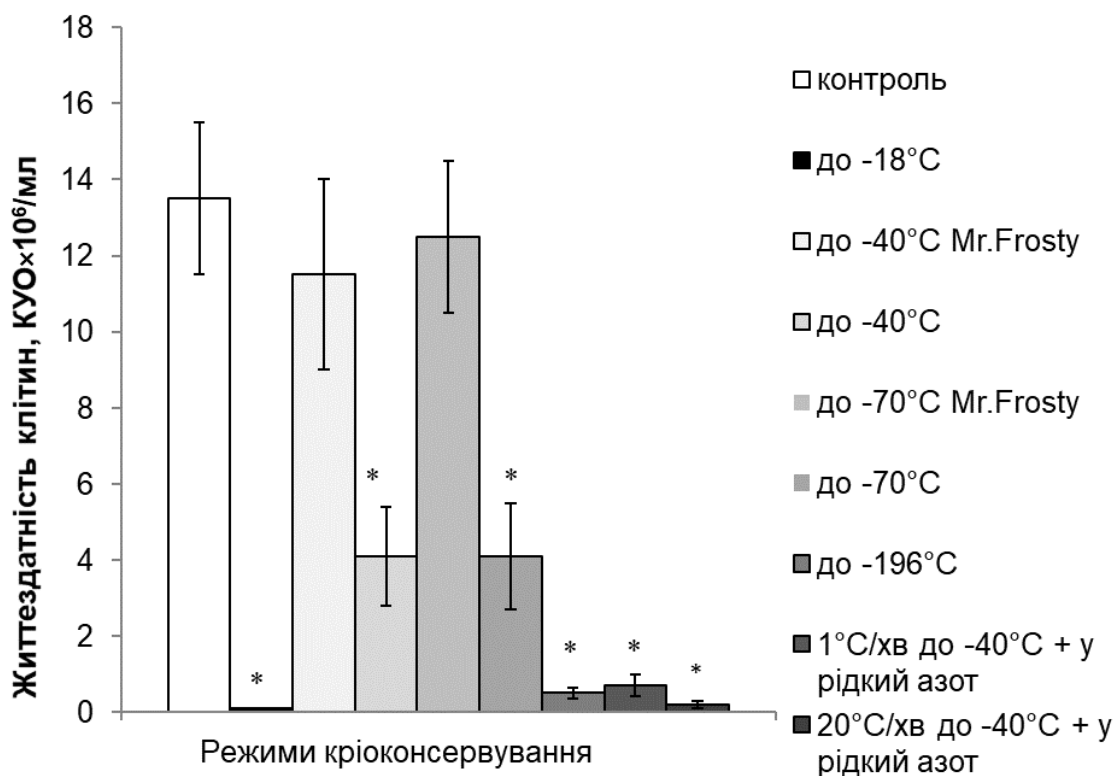


Рис 1. Вплив режимів криоконсервування на життєздатність клітин *C. dissectum* після зберігання за різних температурних режимів протягом двох діб, КУО×10⁶/мл (M±σ). * різниця значуща, по відношенню до контролю, p<0,05

Fig. 1. Effect of cryopreservation regime on *C. dissectum* cells viability after different temperatures storage for two days, CFU×10⁶/ml (M±σ). * significant difference compared to the control, p<0,05

У даній роботі для визначення внеску пошкоджуючої дії першого етапу заморожування до -40°C на життєздатність клітин перед їхнім зануренням у рідкий азот використовували два режими (рис. 4).

Показано, що використання повільного (1 град/хв.) та швидкого охолодження (20 град/хв.) до -40°C знижувало здатність *C. dissectum* до утворення колоній на агаризованому середовищі на 36 та 69% відповідно, порівняно з контролем (рис. 4). За подальшого заморожування клітин до температури рідкого азоту спостерігали різке зменшення величини дослідженого показника – 0,7 та 0,2 КУО×10⁶/мл (рис. 1). Встановлено, що зберігання зразків за -196°C значуще не змінювало величини життєздатності, яка складала 0,4 та 0,1 КУО×10⁶/мл відповідно (рис. 4).

Використання неконтрольованого охолодження мікроводоростей шляхом прямого занурення кріопробірок у рідкий азот призводило до зменшення дослідженого показника з 13,5 до 0,3 (рис. 1). Зберігання зразків за даної температури не викликало додаткових змін (рис. 4).

Хотілося б відмітити, що рівень життєздатності за такого режиму криоконсервування дорівнював такому, отриманому за умов програмного двоетапного заморожування, яке потребує додаткового обладнання та додаткових витрат холодагенту (рис. 4).

Хоча використання субоптимальних умов навколишнього середовища, включаючи температуру інкубації та освітлення (для зниження інтенсивності росту), є стандартним підходом до підтримки колекційних культур водоростей (Lorenz et al., 2005), воно вважається незадовільним у контексті важливих для біотехнології зразків, як з точки зору безпеки штаму, так і забезпечення їхньої продуктивності (Smith, Ryan, 2008).

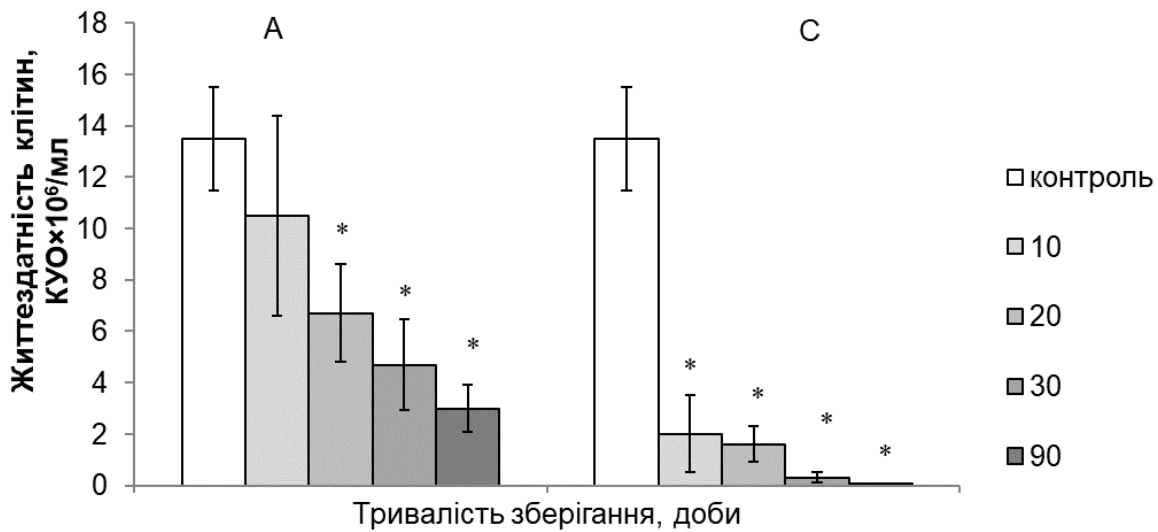


Рис. 2. Життєздатність *C. dissectum* після зберігання за температури -40°C протягом 90 діб, КУО $\times 10^6$ /мл: А – контрольоване охолодження, С – неконтрольоване охолодження ($M \pm \sigma$). * різниця значуща, по відношенню до контролю, $p < 0,05$

Fig. 2. *C. dissectum* viability after storage at -40°C for 90 days, CFU $\times 10^6$ /ml: A – controlled cooling, C – uncontrolled cooling ($M \pm \sigma$). * significant difference compared to the control, $p < 0,05$

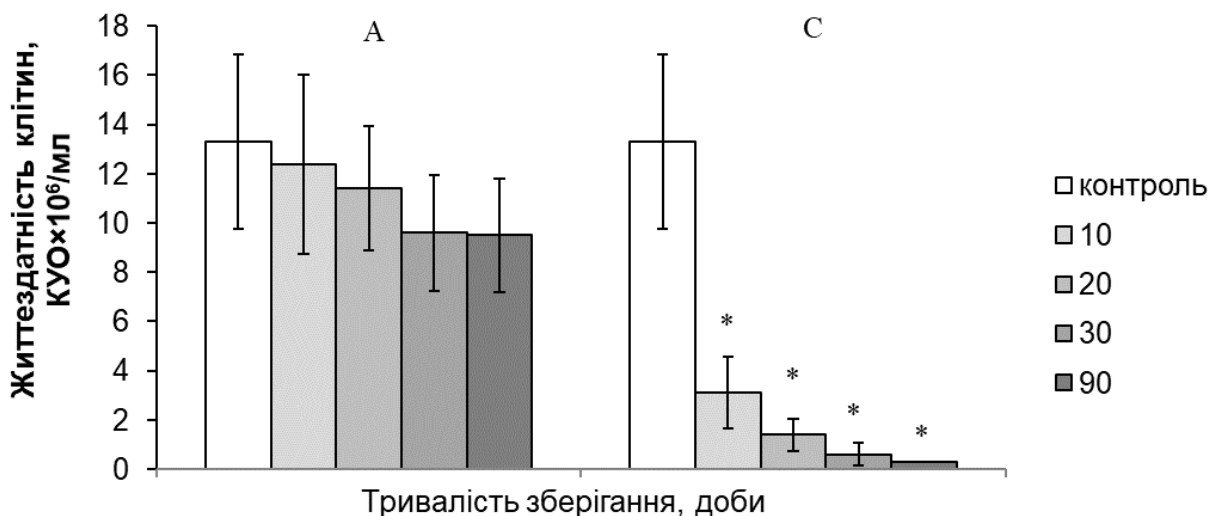


Рис. 3. Життєздатність *C. dissectum* після зберігання за температури -70°C , КУО $\times 10^6$ /мл: А – контрольоване охолодження, С – неконтрольоване охолодження ($M \pm \sigma$). * різниця значуща, по відношенню до контролю, $p < 0,05$

Fig. 3. *C. dissectum* viability after storage at -70°C , CFU $\times 10^6$ /ml: A – controlled cooling, C – uncontrolled cooling ($M \pm \sigma$). * significant difference compared to the control, $p < 0,05$

Якщо для біологічного об'єкту розроблено ефективні методології зберігання при низьких температурах загалом та у рідкому азоті зокрема, то такі підходи вважаються оптимальними (Smith, Ryan, 2008). Стійкість біологічних матеріалів до низькотемпературного зберігання залежить від здатності зразків уникнути крипошкодження, спричиненого фізичними та хімічними змінами, пов'язаними із заморожуванням навколишнього середовища та самого організму. Для водоростей, як і для інших біологічних груп, не існує універсального методу, хоча існують опубліковані стандартні

операційні протоколи, застосовні для різних ціанобактерій, мікро- та макроводоростей, які передбачають використання криозахисних сполук та контрольованих умов охолодження (Charrier et al., 2018; Sharma et al., 2013). Незалежно від методологічного підходу, першочергове значення має стабільність збережених зразків. Теоретично, якщо температури зберігання достатньо низькі, щоб запобігти молекулярному руху, то такі зразки повинні бути фактично інертними.

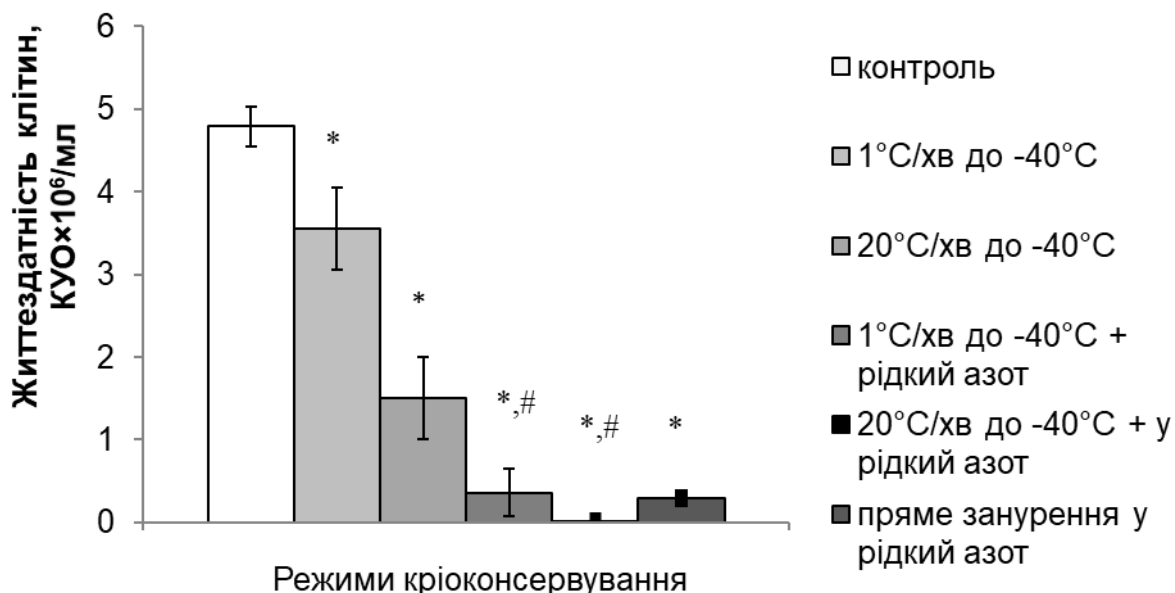


Рис. 4. Життєздатність *C. dissectum* після зберігання за температури рідкого азоту протягом року, КУО×10⁶/мл (M±σ). * різниця значуща, по відношенню до контролю, # різниця значуща по відношенню до зразків, які не піддавали дії температури рідкого азоту, p<0,05

Fig. 4. *C. dissectum* viability after storage at liquid nitrogen temperature for a year, CFU×10⁶/ml (M±σ). * significant difference compared to the control, # significant difference compared to the samples that were not exposed to liquid nitrogen temperature, p<0,05

У літературі майже відсутні дані успішного низькотемпературного зберігання водоростей за відсутності або за невисоких концентрацій криопротекторів. Встановлено, що клітини двох штамів *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* та *Tetraselmis tetraathele* повністю втрачали життєздатність після двоетапного криоконсервування у рідкому азоті із застосуванням розчинів диметилсульфоксиду, гліцерину, етиленгліколю у 5%-й концентрації (Nakanishi et al., 2012). Повідомлялося про криоконсервування 19 штамів прісноводних мікроводоростей *Palmellopsis* sp., *Chlamydomonas* sp., *Palmellopsis* sp. без додавання криопротекторів. Було показано, що тільки 7 з досліджених штамів зберегли здатність до утворення колоній, при цьому величина цього показника становила менш ніж 10%, порівняно з контрольним значенням (Vui et al., 2013).

Досліджували можливість низькотемпературного зберігання *C. vulgaris* без додавання криопротекторів. Спостерігали зниження життєздатності цієї культури більш ніж вдвічі протягом 30-ти діб та майже в чотири рази після 4-х місяців перебування за температури -80°C. Зберігання зразків за температури -15°C було можливим тільки протягом 24 годин, після чого відзначали майже повну загибель клітин (Karoore et al., 2019).

Отримані нами результати показали, що для довготривалого зберігання суспензійної культури *C. dissectum* перспективним є використання морозильних камер з температурою -70°C та режиму охолодження у контейнері для заморожування Mr. Frosty. Однак ця робота потребує подальшого дослідження, а саме збільшення терміну зберігання. Для середньострокового зберігання (протягом 20 діб) можна рекомендувати температуру -40°C. Для криоконсервування зразків цієї мікроводорості за температур рідкого азоту необхідно провести серію досліджень з використання криопротекторів різних класів хімічних сполук та їхніх сумішей з метою підвищення показника життєдіяльності.

Висновки

Результати дослідження показали, що зберігання *C. dissectum* неможливе в умовах побутової морозильної камери (за температури -18°C). Використання неконтрольованого охолодження до -40 та -70°C з метою довготривалого підтримання зразків недоцільне, оскільки спостерігається значна втрата показника життєздатності протягом 10 діб.

Для довготривалого зберігання суспензійної культури *C. dissectum* перспективним є використання морозильних камер з температурою -70°C та режиму охолодження у контейнері для заморожування Mr. Frosty. Для середньострокового зберігання (протягом 20 діб) можна рекомендувати температуру -40°C за умов використання контейнера для заморожування Mr. Frosty.

Кріоконсервування мікроводорості за температур рідкого азоту за досліджених режимів значуще знижує здатність клітин до утворення колоній, аж до повної втрати життєздатності.

References

- Abreu L., Borges L., Marangoni J., Abreu P.C. (2012). Cryopreservation of some useful microalgae species for biotechnological exploitation. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1579–1588. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9818-0>
- Al-Rikabey M.N., Al-Mayah A.M. (2018). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in BG-11 media using Taguchi method. *Jour. of Adv. Research in Dynamical & Control System*, 10(7), 19–30.
- Ananyina G.E., Stepanyuk L.V., Visekantsev I.P., Petrov I.V. (2020). Influence of hypothermic and low-temperature storage conditions on the viability of immobilized probiotic *Bifidobacterium bifidum*. *Actual problems of modern medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Stomatological Academy*, 3(71), 185–191. (In Ukrainian)
- Aravantinou A.F., Manariotis I.D. (2016). Effect of operating conditions on *Chlorococcum* sp. growth and lipid production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(1), 1217–1223. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.01.028>
- Bui T.V.L., Ross I.L., Jakob G., Hankamer B. (2013). Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. *PloS one*, 8(11), e78668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078668>
- Charrier B., Wichard T., Reddy C.R.K. (Eds.). (2018). *Protocols for macroalgae research*. CRC Press. 518 p. <https://doi.org/10.1201/b21460>
- Chernobai N.A., Vozovik K.D., Kadnikova N.G. (2021). Comparative analysis of methods for assessing the preservation of microalgae cultures of *Dunaliella salina* Teodoresco and *Chlorococcum dissectum* Korshikov (Chlorophyta) after exposure to stress factors, *Algologia*, 31(4), 353–364. <https://doi.org/10.15407/alg31.04.353> (In Ukrainian)
- Day J.G., Fleck R.A. (2015). Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of microalgae. *Microalgae Biotechnol*, 1(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/micbi-2015-0001>
- Day J.G., Harding K. (2008). Cryopreservation of algae. *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York, NY. 95–116. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_6
- Day J.G., Brand J.J. (2005). Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, Elsevier. 165–187. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50013-5>
- Hasan C.M.M., Aftabuddin S., Sharif M., Khan M. (2016). Triacylglycerol profile of a microalga *Chlorococcum* sp. as a potential biofuel feedstock. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 40(2), 147–153. <https://doi.org/10.3329/jbas.v40i2.30770>
- Hipkin R., Day J.G., Rad-Menéndez C., Mock T. (2014). The first evidence for genotypic stability in a cryopreserved transgenic diatom. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 65–71. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0047-y>
- Kapoor R.V., Huete-Ortega M., Day J.G. et al. (2019). Effects of cryopreservation on viability and functional stability of an industrially relevant alga. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38588-6>
- Kirsop B.E., Doyle A. (1991). *Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods*. ed. 2. Academic Press Inc. 308 p. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90255-z](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90255-z)
- Lorenz M., Friedl T., Day J.G. (2005). Perpetual maintenance of actively metabolizing microalgal cultures. *Algal culturing techniques*. Academic Press, Elsevier. 145–155. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50011-1>

- McWilliams A. (2018). Microbial products: technologies, applications and global markets. *Wellesley: BCC Research*. 132 p.
- Nakanishi K., Deuchi K., Kuwano K. (2012). Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1381–1385. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9790-8>
- Rehman Z.U., Anal A.K. (2019). Enhanced lipid and starch productivity of microalga (*Chlorococcum* sp. TISTR 8583) with nitrogen limitation following effective pretreatments for biofuel production. *Biotechnology Reports*, 21, e00298. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00298>
- Sharma N.K., Rai A.K., Stal L.J. (2013). *Cyanobacteria: an economic perspective*. John Wiley & Sons. i–xxv. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118402238>
- Smith D., Ryan M.J. (2008). The impact of OECD best practice on the validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *CryoLetters*, 29(1), 63–72.
- Walters C., Wheeler L., Stanwood P.C. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology*, 48(3), 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.007>

Effect of low temperature storage conditions on the viability of microalgae *Chlorococcum dissectum* K.D. Vozovyk, N.O. Shevchenko

Chlorococcum dissectum Korshikov, 1953 is a unicellular freshwater green alga capable of accumulating and depositing lipids in cells. Regardless of their origin and taxonomic classification, biotechnologically important microorganisms and cell lines are biological resources that are used to produce various products. The aim of the work was to determine the effect of low-temperature storage conditions on the alga viability. The temperatures used were as follows: –18, –40, –70, and –196°C. An ordinary household freezer was used to provide –18°C. Cooling to –40 and –70°C was carried out with uncontrolled cooling rates by placing the cryotubes directly into the freezers or using a Mr. Frosty freezing container, which provides a temperature decrease rate of 1 deg/min. Freezing to –196°C was carried out by direct immersion of cryotubes in liquid nitrogen and two-stage cooling at 1 and 20 deg/min to –40°C with subsequent transfer to a cryostorage. The viability of *C. dissectum* was determined by counting the colonies formed on BG-11 agarized nutrient medium. It was found that the cells completely lost their viability after freezing to –18°C and storage for two days. Cryopreservation to –196°C for all studied variants and uncontrolled cooling rate to –40 and –70°C, as well as further storage of such samples at these temperatures, led to significant or complete loss of their viability. Cooling in a Mr. Frosty freezer container to –40 and –70°C did not affect the ability of cells to grow. Moreover, storing *C. dissectum* at –40°C did not cause a significant loss of viability throughout the study period, and its storage at –70°C did not change the viability index at all. The obtained results showed that the controlled cooling and the use of freezers at –40°C and –70°C, respectively, are promising for medium-term and long-term storage of *C. dissectum* suspension culture. To increase the viability of samples after cooling to liquid nitrogen temperature, it is necessary to develop cryopreservation modes using cryoprotectants.

Key words: *microalgae, C. dissectum, viability, low-temperature storage, cryopreservation.*

Cite this article: Vozovyk K.D., Shevchenko N.O. Effect of low temperature storage conditions on the viability of microalgae *Chlorococcum dissectum*. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series "Biology"*, 2022, 39, 12–19. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2022-39-2>. (In Ukrainian)

About the authors:

K.D. Vozovyk – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavskaya st., 23, Kharkiv, Ukraine, 61015, k.vozovik@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9743-001X>
N.O. Shevchenko – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Pereyaslavskaya st., 23, Kharkiv, Ukraine, 61015, shevchenko_nadyusha@ukr.net, <https://orcid.org/0000-0001-6794-1444>

Received: 02.11.2022 / Revised: 05.11.2022 / Accepted: 07.12.2022