

УДК 582.232(066)

**ХРАНИЛИЩЕ АНГИДРОБИОЗНЫХ КУЛЬТУР
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ЦИАНОБАКТЕРИЙ
ИНСТИТУТА БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ ИМЕНИ А. О. КОВАЛЕВСКОГО РАН**

© 2020 г. **И. А. Харчук**

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: seaferm@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2019; после доработки 17.09.2019;
принята к публикации 27.03.2020; опубликована онлайн 31.03.2020.

Надёжное сохранение культур микроводорослей и создание генетических банков штаммов — одна из важных задач современной биологии. В каталоге Всемирной федерации культур в базе WDCM CCINFO на сегодняшний день зарегистрировано 792 коллекции различных культивируемых организмов из 76 стран. Это самая обширная сводная база данных, включающая как известные крупные коллекции, так и небольшие хранилища исследовательских и образовательных учреждений со всего мира. В базе представлено 47 альгологических коллекций и 80 коллекций микроорганизмов, которые также включают культуры микроводорослей и цианобактерий. В России зарегистрировано всего 30 биологических коллекций; фонды только 13 из них включают штаммы водорослей. Самый распространённый способ хранения культур микроводорослей — метод их периодических пересевов на жидкие среды или агар. Его используют в 127 коллекциях (99 % от общего количества в каталоге). Также применяют криоконсервацию — в 33 коллекциях (27 %), лиофилизацию — в 13 (11 %), L-высушивание — в 5 (4 %), замораживание — в 19 (16 %), иммобилизацию в альгинатных бусинках — в 1 (0,8 %). Между тем при использовании этих методов изменяются морфологические и функциональные свойства клеток сохраняемых культур и происходит их измельчение. Кроме того, поддержание культур в жизнеспособном состоянии трудоёмко и требует дорогостоящего оборудования. При этом хранение микроводорослей, переведённых в состояние ангидробиоза путём их обезвоживания, просто и экономически выгодно. Ангидробиоз — глубокое и длительное торможение метаболизма, обратимое при благоприятных условиях; это достаточно распространённое явление в природе. Единственная коллекция из базы WDCM CCINFO, для которой применяют способ перевода клеток в покоящееся состояние путём ангидробиоза (для почвенных водорослей) — коллекция культур водорослей Киевского национального университета (ASKU WDCM 994). Многолетние опыты по переводу микроводорослей в состояние ангидробиоза позволили разработать метод их длительного хранения без использования питательных сред, включающий перевод клеток в состояние ангидробиоза, их сохранение в дегидратированном состоянии и последующее выведение в активную культуру. С целью поддержания альгологического биоразнообразия на базе ФИЦ ИнБИОМ создано хранилище микроводорослей, переведённых в состояние ангидробиоза; их при необходимости можно вывести в активные культуры. Объектами стали морские одноклеточные водоросли, а также пресноводные и галобные виды низших фототрофов, перспективные для аквакультуры и биотехнологии. Культуры получены в виде инокулята из коллекции живых культур планктонных микроводорослей ФИЦ ИнБИОМ. Водоросли выращивали в накопительном режиме при постоянном освещении. Биомассу собирали во время культивирования альгологически чистых культур микроводорослей на стадии замедления роста или на стационарной стадии. Клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием

или путём их фильтрации на планктонном сите. Затем водоросли обезвоживали и хранили в герметичных зиплок-пакетах, помещённых в пластиковые ёмкости объёмом от 100 до 500 мл, при температуре +18...+21 °С в темноте в специально оборудованном помещении. Основная часть коллекции представлена штаммами из отделов Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, Rodophyta. В статье приведены список видов и количество сохраняемых изолятов, представлена информация о формах хранения, описан технологический регламент обслуживания и пополнения хранилища ангидробиозных культур. Хранилище находится на стадии формирования. Его будущее связано с расширением фонда за счёт морских, пресноводных и галобных видов. Оптимизация способа обезвоживания позволит перевести в состояние ангидробиоза микроводоросли, относящиеся к разным систематическим отделам.

Ключевые слова: микроводоросли, ангидробиоз, жизнеспособность, дегидратация, хранение микроводорослей и цианобактерий

Одной из важных задач современной биологии является надёжное сохранение культур микроводорослей и создание генетических банков штаммов. Согласно каталогу Всемирной федерации культур (World Federation for Culture Collections), в базе WDCM CCINFO [27] на сегодняшний день зарегистрировано 792 коллекции различных культивируемых организмов из 76 стран. Самым распространённым способом хранения культур микроводорослей является метод их периодических пересевов на жидкие среды [1, 2, 4, 15, 17, 23] или агар [3, 4, 15]. В каталоге представлено 47 альгологических коллекций и 80 коллекций разнообразных микроорганизмов, которые также включают культуры микроводорослей и цианобактерий. Метод периодических пересевов культур на жидкие среды или агар применяют в 127 коллекциях (99 % от их общего количества в каталоге). Также используют криоконсервацию — в 33 коллекциях (27 %) [5, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, 28], лиофилизацию — в 13 (11 %) [26], L-высушивание — в 5 (4 %) [21], замораживание — в 19 (16 %), иммобилизацию в альгинатных бусинках — в 1 (0,8 %) [11, 12]. При применении этих методов происходят изменение морфологических и функциональных свойств и измельчение клеток сохраняемых культур. Кроме того, поддержание культур в жизнеспособном состоянии трудоёмко и требует дорогостоящего оборудования.

Хранение микроводорослей, переведённых в состояние ангидробиоза путём их обезвоживания, — простой и экономически выгодный способ. Ангидробиоз — глубокое и длительное торможение метаболизма, обратимое при благоприятных условиях. Данное явление, достаточно распространённое в природе, легло в основу способа перевода клеток в покоящееся состояние. Единственная коллекция из базы WDCM CCINFO, для которой применяют этот метод для почвенных водорослей, — коллекция культур водорослей Киевского национального университета (АСКУ WDCM 994) [3].

Многолетние опыты позволили разработать способ длительного хранения микроводорослей без применения питательных сред, включающий перевод клеток в состояние ангидробиоза, их сохранение в дегидратированном состоянии и последующее выведение в активную культуру [6].

Метод апробирован на про- и эукариотических микроводорослях — морских, галобных и пресноводных видах; его успешно используют в ФИЦ ИнБЮМ. По инициативе к. б. н. Р. П. Тренкеншу в отделе биотехнологий и фиторесурсов в 2005 г. создана коллекция ангидробиозных культур низших фототрофов, обратимых в жизнеспособное состояние и сохранивших способность к делению.

Цель создания коллекции — надёжное сохранение культур низших фототрофов, пригодных также для создания генетического банка штаммов. Практическое значение хранилища связано с возможностью постоянно иметь в своём распоряжении жизнеспособные культуры для обеспечения экспериментальных научно-исследовательских работ. В дальнейшем планируется использовать коллекцию в качестве банка микроводорослей и цианобактерий для сохранения редких и эндемичных видов, водорослей, богатых биологически активными веществами и перспективных для прикладного использования в биотестировании, биомониторинге, биоремедиации и научно-образовательном процессе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культуры были получены в виде инокулята из коллекции живых культур планктонных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ [9]. Водоросли выращивали в накопительном режиме при постоянном освещении. Биомассу собирали во время культивирования альгологически чистых культур микроводорослей на стадии замедления роста или на стационарной стадии. Клетки отделяли от культуральной среды с помощью центрифугирования при 3000 об·мин.⁻¹ на центрифуге ОПН-3-УХЛ 42 или путём их фильтрации на планктонном сите 100 ПЭ [20]. Выбор способа фильтрации зависел от размера клеток и трихом низших фототрофов.

Подготовку к закладке осуществляли тремя способами:

- 1) для удаления солей клетки промывали от культуральной среды раствором углекислого аммония, а затем — дистиллированной водой, далее клетки обезвоживали;
- 2) водоросли, подлежащие закладке на длительное хранение, дегидратировали вместе с культуральной средой;
- 3) клетки низших фототрофов суспензировали с протекторами.

Для каждой микроводоросли закладку осуществляли разными способами, чтобы иметь возможность провести сравнительный анализ по критерию жизнеспособности клеток низших фототрофов, сохраняемых длительное время, и выявить оптимальный метод.

На начальном этапе микроводоросли дегидратировали при температуре +20...+70 °С с шагом 10 °С. После серии экспериментов был выбран температурный диапазон +30...+40 °С [8]. Контроль уровня остаточной влажности осуществляли во время сушки; значения показателя находились в пределах 10–17 % для большинства дегидратированных клеток [7]. Сухие водоросли хранили в герметичных зиплок-пакетах, помещённых в пластиковые ёмкости объёмом 100–500 мл, при температуре +18...+21 °С в темноте в специально оборудованном помещении.

Хранилище состоит из бокса и помещения, выполняющего функцию инкубационно-стабилизирующего пространства перед входом в камеру хранения, а также предназначенного для проведения манипуляций с образцами. В боксе установлен кондиционер для осушения воздуха и поддержания заданной температуры.

Каждый образец снабжён этикеткой, на которой приведена информация о названии культуры, условиях обезвоживания (температуре и длительности), дате перевода в состояние ангидробиоза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первыми коллекционными образцами были таблетки спирулины, переданные от производителей (ООО «Агро-Виктория») и приобретённые в аптеках города. Таблетки цианопрокариотов реактивировали, адаптировали к условиям культивирования и переводили в интенсивную культуру. Затем культуры подлежали повторному переводу в анабиоз. Метод апробировали на микроводорослях разных отделов.

На сегодняшний день на длительное хранение заложено 366 образцов обезвоженных культур микроводорослей из четырёх отделов: цианобактерии Cyanophyta (Cyanobacteria), зелёные микроводоросли Chlorophyta, красные водоросли Rodophyta и диатомовые водоросли Bacillariophyta (рис. 1).

Основная часть коллекции представлена штаммами из отдела Chlorophyta и содержит виды *Dunaliella salina* (Dunal) Teodorescu, 1905; *Tetraselmis viridis* Rouchijajnen, 1966; *Chlorella vulgaris* f. *suboblonga* V. M. Andreeva, 1975; *Chlorella* sp.; *Scenedesmus* sp. Отдел Cyanophyta представлен четырьмя видами (*Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Nordstedt) Gomont, 1892; *Synechococcus elongates* (Nägeli) Nägeli, 1849; *Oscillatoria amoena* (Kützinger) Gomont, 1892; *Nostoc commune* var. *flagelliforme* Bornet & Flahault, 1886); отдел Bacillariophyta — двумя (*Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, 1897; *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin, 1964); отдел Rodophyta — одним (*Porphyridium purpurum* (Bory de Saint-Vincent) Drew and Ross, 1965) (табл. 1).

Таблица 1. Таксономическое разнообразие цианобактерий и водорослей в коллекции ангидробиозных культур ФИЦ ИнБЮМ**Table 1.** Taxonomic diversity of cyanobacteria and algae in IBSS RAS collection of anhydrobiotic cultures

Отдел	Порядок	Род	Вид	Когда и откуда получен/выделен	Число сохраняемых образцов
CHLOROPHYTA	Chlamydomonadales	<i>Dunaliella</i>	<i>Dunaliella salina</i>	Солёные озёра Сиваша (Крым)	126
	Sphaeropleales	<i>Scenedesmus</i>	<i>Scenedesmus</i> sp.	Сопутствующий при выращивании хлореллы	3
	Chlorodendrales	<i>Tetraselmis</i>	<i>Tetraselmis viridis</i>	Чёрное море	37
	Chlorellales	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	Институт ботаники (Киев, Украина)	12
			<i>Chlorella</i> sp.	ООО «Ихляс-агроэнергия»	20
CYANOBACTERIA	Oscillatoriales	<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria amoena</i>	Обнаружен при выращивании <i>Spirulina platensis</i>	2
			<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	МГУ (Сочи)	94
	Synechococcales	<i>Synechococcus</i>	<i>Synechococcus elongates</i>	Сопутствующий при выращивании спирулины	3
	Nostocales	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc commune</i>	Институт ботаники (Киев, Украина)	3
BACILLARIOPHYTA	Bacillariales	<i>Phaeodactylum</i>	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	Чёрное море	23
		<i>Cylindrotheca</i>	<i>Cylindrotheca closterium</i>	Альгобанк (Кан, Франция), Средиземное море	3
RHODOPHYTA	Porphyridiales	<i>Porphyridium</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>	БНИИ (Санкт-Петербург)	74

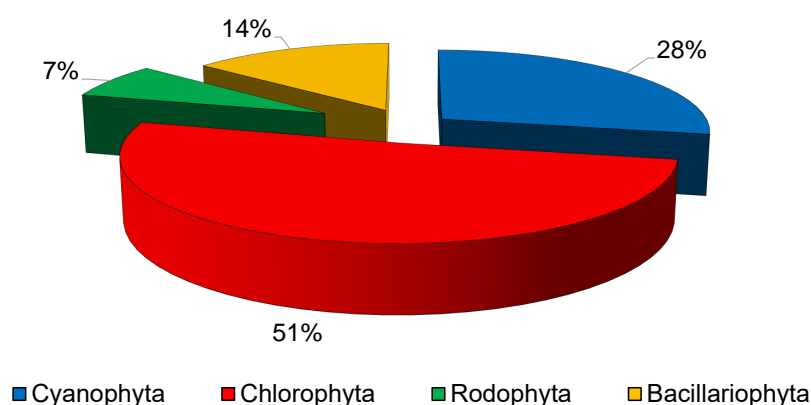


Рис. 1. Соотношение численности штаммов водорослей из разных отделов в коллекции ангидробиозных культур ФИЦ ИнБЮМ

Fig. 1. Ratio of the number of algae strains from different phyla in IBSS RAS collection of anhydrobiotic cultures

Сохраняемые микроводоросли и цианобактерии переведены в состояние ангидробиоза при разных режимах обезвоживания, в том числе при различной температуре и длительности дегидратации. Образцы одних и тех же водорослей и цианобактерий были обезвожены в разные годы, подвергались дегидратации с различными протекторами и без них. Это связано с тем, что предельные сроки их хранения ещё не установлены. Формы хранения низших фототрофов представлены на рис. 2 и 3. С целью определения физико-химических изменений микроводорослей в зависимости от сроков хранения из коллекции периодически изымали аликвоты культур и проводили их биохимический контроль и реактивацию.

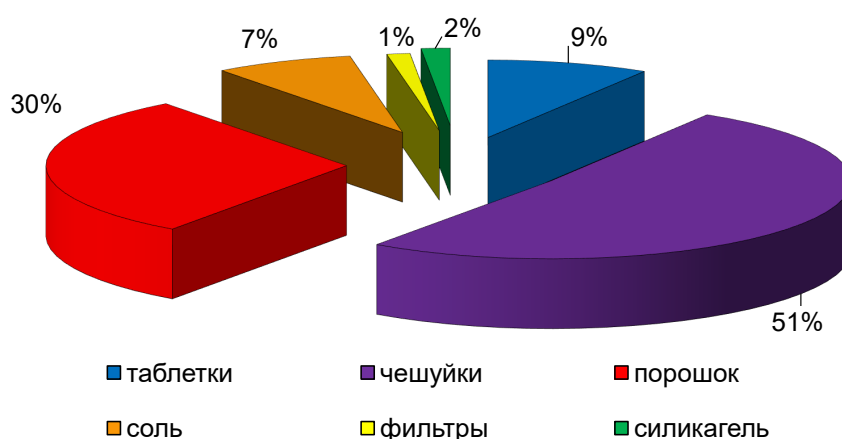


Рис. 2. Формы закладки микроводорослей и цианобактерий на длительное хранение

Fig. 2. Forms of microalgae and cyanobacteria preservation for long-term storage

С целью сохранения культур низших фототрофов применён технологический регламент обслуживания и пополнения коллекции ангидробиозных культур, описанный в табл. 2.

Оптимизация метода даёт возможность перевести в состояние ангидробиоза микроводоросли, относящиеся к разным систематическим отделам. Метод может быть рекомендован для применения в научных и учебных учреждениях. Его можно использовать в биотехнологиях, где требуется длительное сохранение штаммов музейных культур. Хранилище ФИЦ ИнБЮМ на современном этапе является уникальным и не имеет аналогов. Пополнение коллекции ангидробиозных культур новыми видами низших фототрофов продолжается постоянно.

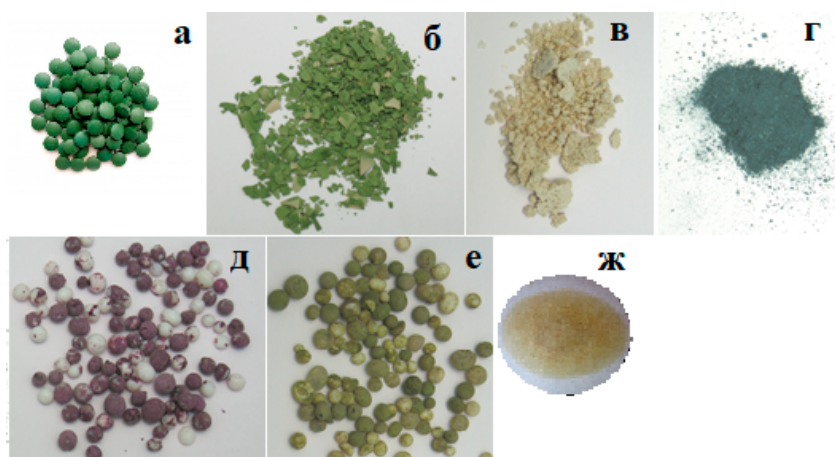


Рис. 3. Внешний вид обезвоженных проб микроводорослей и цианобактерий, заложенных на хранение:

а — таблетки; б — чешуйки; в — соль; г — порошок; д, е — силикагель; ж — фильтры

Fig. 3. Appearance of dehydrated samples of microalgae and cyanobacteria stored:

а – tablets; б – flakes; в – salt; г – powder; д, е – silica gel; ж – filters

Таблица 2. Технологический регламент обслуживания и пополнения коллекции ангидробиозных культур микроводорослей и цианобактерий

Table 2. Technological regulations for servicing and replenishing the collection of anhydrobiotic cultures of microalgae and cyanobacteria

Номер этапа	Название этапа	Проводимые манипуляции
I	Получение ангидробиозной культуры	<ul style="list-style-type: none"> • Получение альгологически чистой культуры из природной популяции; • паспортизация культуры; • адаптация культуры к искусственным условиям выращивания; • интенсивное культивирование; • перевод культуры в состояние ангидробиоза; • подготовка к длительному хранению.
II	Биохимический контроль сохраняемых видов микроводорослей и цианобактерий	Комплексный биохимический анализ низших фототрофов, подлежащих закладке на длительное хранение (определение содержания хлорофиллов, суммарных каротиноидов, общих белков, углеводов, липидов и нуклеиновых кислот).
III	Хранение и контроль жизнеспособности сохраняемых культур	<ul style="list-style-type: none"> • Определение живых и мёртвых клеток низших фототрофов; • биохимический контроль сохраняемых образцов; • реактивация и оценка способности к росту на жидких средах.
IV	Ведение каталога ангидробиозных культур	Разработка электронного каталога. Он включает информацию о наименовании штамма, номер, форму хранения, дату перевода в состояние ангидробиоза и условия обезвоживания, данные о культивировании (в том числе ростовые характеристики), результаты биохимического анализа перед закладкой и в течение хранения, сведения о предшествовавшей реактивации, морфологические и биохимические характеристики водорослей после реактивации.

Заключение. Коллекция ангидробиозных культур ФИЦ ИнБЮМ находится на стадии формирования. Её будущее связано с расширением фонда за счёт морских, пресноводных и галобных видов. Разработка индивидуальных протоколов обезвоживания и реактивации позволит перевести в состояние ангидробиоза микроводоросли, относящиеся к разным систематическим отделам.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Айздайчер Н. А. Коллекция культур морских микроводорослей Института биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН // *Биология моря*. 2008. Т. 34, № 2. С. 152–155. [Aizdaicher N. A. Collection of marine microalgae at the A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology. *Biologiya morya*, 2008, vol. 34, no. 2, pp. 152–155. (in Russ.)]
2. Владимиров М. Г., Игнатъевская М. И. Изучение влияния условий хранения культур *Chlorella* в коллекции на последующую их продуктивность // *Микробиология*. 1966. Т. 35, № 3. С. 539–548. [Vladimirova M. G., Ignat'evskaya M. I. Izucheniye vliyaniya uslovii khraneniya kul'tur *Chlorella* v kollektzii na posleduyushchuyu ikh produktivnost'. *Mikrobiologiya*, 1966, vol. 35, no. 3, pp. 539–548. (in Russ.)]
3. Костиков И. Ю., Демченко Э. Н., Березовская М. А. Коллекция культур водорослей Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Каталог штаммов (2008 г.) // *Чорноморський ботанічний журнал*. 2009. Т. 5, № 1. С. 37–79. [Kostikov I. Yu., Demchenko E. N., Berezovskaya M. A. Microalgae culture collection at the Taras Shevchenko National University, Kyiv. Catalogue of strains (2008). *Chornomorskyi botanichnyi zhurnal*, 2009, vol. 5, no. 1, pp. 37–79. (in Russ.)]
4. Новаковская И. В., Патова Е. Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // *Известия Коми научного центра УрО РАН*. 2012. Вып. 2, № 10. С. 36–41. [Novakovskaya I. V., Patova E. N. Collection of living microalgae strains of the Institute of Biology, Komi Science Centre, Ural Branch, RAS, and its perspective using. *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra UrO RAN*, 2012, iss. 2, no. 10, pp. 36–41. (in Russ.)]
5. Одинцова Н. А., Борода А. В. Криосохранение клеток и личинок морских гидробионтов // *Биология моря*. 2012. Т. 38, № 2. С. 93–103. [Odintsova N. A., Boroda A. V. Cryopreservation of the cells and larvae of marine organisms. *Biologiya morya*, 2012, vol. 38, no. 2, pp. 93–103. (in Russ.)]
6. Пат. 2541452 Российская Федерация. МПК6 С 12 N 1/04. *Способ длительного хранения микроводорослей* / Харчук И. А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН». № 2014149881/93 ; заявл. 26.09.2014 ; приор. 17.03.2008 ; опубл. 10.02.2015 , Бюл. № 4. [Pat. 2541452 Rossiiskaya Federatsiya. МПК6 S 12 N 1/04. *Sposob dlitel'nogo khraneniya mikrovodoroslei* / Kharchuk I. A. ; zayavitel' i patentoobladatel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethoe uchrezhdenie nauki "Institut morskikh biologicheskikh issledovaniy imeni A. O. Kovalevskogo RAN". No. 2014149881/93; zayavl. 26.09.2014; prior. 17.03.2008; opubl. 10.02.2015, Byul. no. 4. (in Russ.)]
7. Харчук И. А. Хранение микроводорослей в состоянии ангидробิโอ́за // *Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования* / под ред. Ю. Н. Токарева, З. З. Финенко, Н. В. Шадрин Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. Гл. 9. С. 237–267. [Kharchuk I. A. Khraneniye mikrovodoroslei v sostoyanii angidrobioza. In: *Mikrovodorosli Chernogo morya: problemy sokhraneniya bioraznoobraziya i biotekhnologicheskogo ispol'zovaniya* / Yu. N. Tokarev, Z. Z. Finenko, N. V. Shadrin (Eds). Sevastopol : EKOSI-Gidrofizika, 2008, chap. 9, pp. 237–267. (in Russ.)]
8. Харчук И. А. Динамика жизнеспособности и компонентов биохимического состава *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nords) Gomont в зависимости от температуры дегидратации при переводе в состояние ангидробิโอ́за // *Вопросы современной альгологии*. 2018. № 1 (16). [Kharchuk I. A. Dynamics of viability and components of biochemical composition *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nords) Gomont depending on the dehydration temperature transferring at anhydrobiosis state. *Voprosy sovremennoi al'gologii*, 2018, no. 1 (16). URL: <http://algology.ru/1258> (accessed 23.07.2019). (in Russ.)]
9. Коллекция микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ ИнБЮМ [Электронный ресурс]. : сайт. [Kollektsiya mikrovodoroslei otdela ekologicheskoi fiziologii vodoroslei FITs InBYuM [Electronic resource] : site. URL: http://ibss-ras.ru/?page_id=2828 (accessed 24.07.2019). (in Russ.)]

10. Cañavate J. P., Lubian L. M. Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. *Marine Biology*, 1995, vol. 124, iss. 2, pp. 325–334. <https://doi.org/10.1007/BF00347136>
11. Chen Y. C. Immobilized microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*, 2001, vol. 195, no. 1–2, pp. 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00540-8)
12. Chen Y. C. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. *Journal of Applied Phycology*, 2003, vol. 15, no. 5, pp. 439–444. <https://doi.org/10.1023/A:1026071714199>
13. Crutchfield A., Diller K., Brand J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 1999, vol. 34, iss. 1, pp. 43–52. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736072>
14. Day J. G., Watanabe M. M., Morris G. H., Fleck R. A., McLellan M. R. Long-term viability of preserved eukaryotic algae. *Journal of Applied Phycology*, 1997, vol. 9, no. 2, pp. 121–127. <https://doi.org/10.1023/A:1007991507314>
15. Hur S. B., Bae J. H., Youn J., Jo M. J. KMMCC – Korea Marine Microalgae Culture Center: List of strains, 2nd edition. *Algae*, 2015, vol. 30, suppl., pp. S1–S188. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2015.30.S.S1>
16. Kumari N., Gupta M., Singh R. Open encapsulation-vitrification for cryopreservation of algae. *Cryobiology*, 2016, vol. 73, iss. 2, pp. 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.07.005>
17. Marsalek B., Rojickova-Padrtova R. Long-term maintenance of alga strains for use in biomass assays and biotechnology. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband: Algological Studies*, 1988, vol. 124, pp. 121–136.
18. Meyer M. A. *Cryopreservation of a Marine Diatom*. PhD Thesis. Texas A & M University, College Station, 1985, 112 p.
19. Poncet J.-M., Véron B. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata*. *Biotechnology Letters*, 2003, vol. 25, no. 23, pp. 2017–2022. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000004395.04116.45>
20. Richmond A., Lichtenberg E., Stahl B., Vonshak A. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *Journal of Applied Phycology*, 1990, vol. 2, no. 3, pp. 195–206. <https://doi.org/10.1007/BF02179776>
21. Sakane T. Preservation of microorganisms by L-drying. *International Journal of Reefing*, 1982, vol. 57, no. 6, pp. 767–775.
22. Scarbrough C., Wirschell M. Comparative analysis of cryopreservation methods in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cryobiology*, 2016, vol. 73, iss. 2, pp. 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.07.011>
23. von Schwartzberg K., Bornfleth S., Lindner A., Hanelt D. The Microalgae and Zygnematophyceae Collection Hamburg (MZCH) – living cultures for research on rare streptophytic algae. *Algological Studies*, 2013, vol. 142, pp. 77–108. <http://doi.org/10.1127/1864-1318/2013/0131>
24. Surek B. Meeting report: International Symposium on the Cryopreservation of Algae (Austin, Texas, USA, 16–17 April, 1988). *Protist*, 1998, vol. 149, iss. 3, pp. 201–205. [https://doi.org/10.1016/S1434-4610\(98\)70026-4](https://doi.org/10.1016/S1434-4610(98)70026-4)
25. Tessarolli L. P., Day J. G., Vieira A. H. Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 2017, vol. 17, no. 2, e20160299. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0299>
26. Tsuru S. Preservation of marine and fresh water algae by means of freezing and freeze-drying. *Cryobiology*, 1973, vol. 10, iss. 5, pp. 445–452. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(73\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(73)90074-6)
27. WDCM CCINFO. *World Data Centre for Microorganisms, Culture Collections Information Worldwide*. 2014. [Electronic resource.] URL: <http://www.wfcc.info/ccinfo/home> (accessed 23.07.2019).
28. Zheng L., Lu Z., Zhang Q., Li T., Song L. A fluorescence ratio-based method to determine microalgal viability and its application to rapid optimization of cryopreservation. *Cryobiology*, 2018, vol. 81, pp. 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.014>

**THE STORAGE OF ANHYDROBIOTIC CULTURES
OF MICROALGAE AND CYANOBACTERIA
OF A. O. KOVALEVSKY INSTITUTE OF BIOLOGY OF THE SOUTHERN SEAS OF RAS**

I. A. Kharchuk

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

Reliable preservation of microalgae cultures and creation of genetic banks of strains is one of the important tasks of modern biology. To date, 792 collections of various cultivated organisms from 76 countries are registered in the catalog of the World Federation for Culture Collections in the WDCM CCINFO database. This is the most extensive consolidated database of culture collections, which includes both well-known large collections and small repositories of research and educational institutions from all over the world. The database contains 47 algological collections and 80 collections of various microorganisms, which also include microalgae and cyanobacteria cultures. Only 30 biological collections are registered in Russia, from which only 13 contain algae strains. The most common technique of microalgae cultures storage is the method of their periodic re-sowing onto liquid media or agar. It is used in 127 collections (99 % of the total number in the catalog). Other methods used are: cryopreservation – in 33 collections (27 %), lyophilization – in 13 (11 %), L-drying – in 5 (4 %), freezing – in 19 (16 %), and immobilization in alginate beads – in 1 (0.8 %). However, when using these methods, there is a change in morphological and functional features of cells of the cultures stored, as well as their shredding. In addition, cultures maintaining in a viable state is time-consuming and requires expensive equipment. Preservation of microalgae, transferred to the state of anhydrobiosis by dehydration, is simple and cost-effective. Anhydrobiosis is a deep and long-term inhibition of metabolism, reversible under favorable conditions; it is a quite common phenomenon in nature. The only collection in the WDCM CCINFO database that applies the method of transferring cells to a resting state (for soil algae) is the collection of algae cultures of the National University of Kyiv (ACKU WDCM 994). Many years of experiments on the transfer of microalgae to the state of anhydrobiosis allowed us to develop a method of long-term preservation of microalgae without the use of nutrient media. This technique includes cells transfer to the state of anhydrobiosis, their preservation in a dehydrated state, and subsequent removal to an active culture. In order to preserve algological biodiversity, IBSS RAS created a repository of microalgae transferred to the state of anhydrobiosis, which can be converted to active cultures if necessary. The objects of the repository were marine unicellular algae, as well as freshwater and halobic species of lower phototrophs which are perspective for biotechnology and aquaculture. The cultures were obtained as an inoculum from IBSS RAS collection of live cultures of planktonic microalgae. The algae were grown in an accumulative mode under constant lighting. The biomass was collected during cultivation of algologically pure microalgae cultures at the growth retardation or at the stationary stage. Cells were separated from the culture medium by centrifugation or by filtering them on a plankton sieve. Then the algae were dehydrated and maintained in hermetic zipper bags placed in plastic containers of 100 to 500 ml, at a temperature of +18...+21 °C in the dark in a specially equipped room. The main part of the collection is represented by strains from the phyla Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta, and Rhodophyta. The list of species, the number of isolates stored, and the information on preservation forms are provided in this article. The technological regulations for maintenance and replenishment of the storage of anhydrobiotic cultures are described. The repository is at the stage of formation. Its future lies in the fund expansion to include marine, freshwater, and halobic species. Optimization of the dehydration method will allow the transfer of microalgae belonging to different systematic phyla to the state of anhydrobiosis.

Keywords: microalgae, anhydrobiosis, viability, dehydration, storage of microalgae and cyanobacteria