



УДК 606:582.232

Низкотемпературная консервация видов Cyanophyta (*Spirulina*, *Arthrospira*)

Д. И. Петрухина

Петрухина Дарья Игоревна, преподаватель кафедры ботаники, микробиологии и экологии Института естествознания, Калужский государственный университет имени К. Э. Циолковского, daria.petrukhina@outlook.com

Актуальность исследования обусловлена тем, что цианеи родов *Spirulina* и *Arthrospira* входят в обширное число коллекций лабораторных культур микроорганизмов, а их традиционное хранение последовательным пересевом субкультур не обеспечивает долговременную сохранность. Данная статья направлена на выявление возможности долговременного низкотемпературного хранения цианей *Spirulina subsalsa* и *Arthrospira platensis*. В работе применяли хранение биомассы цианей в течение 12 месяцев при температуре минус 80°C. Замораживали со скоростью охлаждения минус 1°C. В статье представлены результаты экспериментов по влиянию различных криопротекторов на достижение сравнительно высокой выживаемости цианей после долговременной криоконсервации. Установлено, что оптимальными криопротекторами являются 10%-ные растворы глюкозы и диметилсульфоксида (ДМСО). Криопротекторных свойств не наблюдалось при использовании метанола, глицерина, этанола, D-сорбитола, сахарозы, L-пролина и декстрина. Полученные данные свидетельствуют о том, что *S. subsalsa* и *A. platensis* сохраняют свою жизнеспособность в течение 12 месяцев криоконсервации при минус 80°C. Таким образом, настоящее исследование демонстрирует возможность консервации цианей путем низкотемпературного хранения при минус 80°C. Материалы статьи могут использоваться в прикладной биотехнологии для совершенствования способов длительного хранения различных культур микроорганизмов.

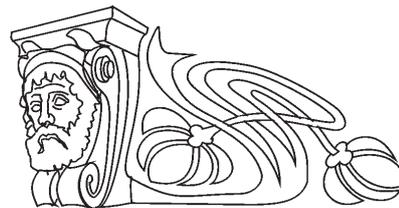
Ключевые слова: криоконсервация, хранение, цианопрокариоты, *Arthrospira platensis*, *Spirulina subsalsa*.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-58-63>

Введение

В последние годы цианеи родов *Spirulina* и *Arthrospira* находят все большее применение в биотехнологических производствах. Однако опубликованные успешные результаты криоконсервации цианей относятся к представителям рода *Arthrospira* [1, 2], а для представителей рода *Spirulina* успешных результатов криоконсервации опубликовано не было. Кроме того, не обнаружено данных об успешной выживаемости представителей *Arthrospira* и *Spirulina* после длительной криоконсервации с температурой хранения минус 80°C.

В связи с этим одной из задач работы является отработка методики длительной криоконсервации цианей (минимум 12 месяцев), прежде всего *Spirulina*, с использованием различных



криопротекторов, а также сравнительное изучение выживаемости разных видов цианей, относящихся к родам *Spirulina* и *Arthrospira*, при замораживании–хранении–оттаивании.

Исследованные в нашей работе штаммы *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 входят в большое число частных коллекций лабораторных культур. Эти штаммы были получены из коллекции культур университета Пастера (Франция), где была проведена их таксономическая идентификация. Также, что крайне важно, в университете Пастера для каждого из используемых штаммов был четко обозначен статус альгологической чистоты (аксеничности).

В нашей работе цианеи родов *Arthrospira* и *Spirulina* замораживали со скоростью минус 1°C/мин до минус 80°C и хранили при этой температуре до 12 месяцев. Данная методика криоконсервации – скорость охлаждения минус 1°C в минуту до минус 80°C и хранение при этой температуре – ранее для *Spirulina* sp. не применялась.

Для выбора соединений в качестве криопротекторов и оценки их эффективности при различной концентрации осуществляли криоконсервацию *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, а после размораживания оценивали выживаемость цианей в процессе рекультивирования.

В экспериментальных работах, посвященных разработке методов криоконсервирования, авторы не приходят к единому мнению относительно критериев выживаемости/жизнеспособности организма. Традиционно решающим фактором для сохранения биологических ресурсов водорослей являлся минимальный уровень жизнеспособности и 60% считается достаточно высоким уровнем [3].

Однако в последнее время акцент в оценке сместился на надежность методики криоконсервирования, при этом «повторяемость» в виде процента жизнеспособных проб стала ключевым фактором вместо высокого уровня жизнеспособности клеток культур [4]. Это связано с тем, что сильные колебания в уровнях жизнеспособности клеток являются общими при криоконсервации водорослей, где могут быть и низкие уровни жизнеспособности (<30%) с периодическим изменением от партии криопроб к партии, и



даже изменением уровней жизнеспособности в пределах отдельной партии криопроб [4].

Важность того, что процент жизнеспособных проб остается на одном и том же уровне, даже если клетки культур из этих проб после криоконсервирования имеют невысокие темпы роста, продиктована еще и тем, что позволит исследователям рассчитывать количество проб, закладываемых на криосохранение, и тем самым, обеспечит высокую воспроизводимость результатов.

Материалы и методы

В работе использовали аксеничные штаммы *Spirulina subsalsa* PCC 9445 и *Arthrospira platensis* PCC 9223 из коллекции культур университета Пастера, Франция.

Исходные культуры цианей выращивали на питательной среде Заррука в автоклавированных конических стеклянных колбах Эрленмейера с широким горлышком объемом 100 мл с пробками из целлюлозной массы. Питательную среду Заррука стерилизовали фильтрованием через стерильный фильтр из ацетата целлюлозы (диаметр пор 0,45 мкм) и в количестве 20 мл добавляли в колбы Эрленмейера. Цианей культивировали при температуре 30 °С в инкубаторе Minitron (фирма Infors HT, Швейцария) с постоянным перемешиванием с помощью встроенного орбитального шейкера диаметром качания 25 мм. Частота вращения составляла 110 об/мин. Освещение обеспечивали шестью люминесцентными лампами GroLux 15W (фирма Osram Sylvania, США), которые располагались над колбами на высоте 40 см, обеспечивая среднюю интенсивность света на поверхности клеточной суспензии 21 мкмоль/(м²с). Выращивание цианей осуществляли с 16-часовым фотоциклом. После окончания цикла культивирования питательную среду удаляли в стерильных условиях, а биомассу цианей промывали стерильной дистиллированной водой. Отмытую биомассу в количестве 0,9 мл помещали в полипропиленовые криофлаконы объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой. Затем в эти же криофлаконы в качестве криопротектора добавляли одномоментно стерильный раствор выбранного криопротектора в двойной концентрации до отметки общего объема в 1,8 мл. После этого криофлаконы выдерживали в темноте при постоянном перемешивании на ротаторе со скоростью 20 об/мин. Время экспозиции зависело от вида криопротектора, для токсичных – 10 мин, для остальных – 20 мин.

После инкубирования с криопротекторами в темноте криофлаконы с цианеями помещали

в полимерный контейнер для замораживания (Mr. Frosty, Nalgene, США), который был предварительно охлажден до 4 °С в течение минимум 5 часов. Данный контейнер обеспечивает воспроизводимую скорость охлаждения минус 1 °С в минуту. Контейнер Mr. Frosty с криофлаконами помещали в морозильную камеру, в которой поддерживалась постоянная температура минус 80 °С. Через 1,5 ч криофлаконы с цианеями перемещали из контейнера Mr. Frosty™ в пластиковые боксы и продолжали хранить при температуре минус 80 °С. Для размораживания криофлаконы с цианеями извлекали из морозильной камеры и переносили на водяную баню с температурой воды 37 °С, где выдерживали до исчезновения льда. После размораживания цианей удаляли из криофлакона и переносили в стерильную колбу Эрленмейера с 5 мл питательной среды Заррука. Эти колбы для предотвращения фотоокисления культивировали в течение первых 40 мин при комнатной температуре в темноте, после чего в них добавляли еще 5 мл питательной среды Заррука. Последующее культивирование проводили в течение 2 ч при освещении 10–12 мкмоль фотонов/(м²с). Затем колбы Эрленмейера с цианеями инкубировали как исходные культуры.

В своей работе оценку качества замороженного биоматериала через исследуемый срок хранения проводили после оттаивания путем сравнительного определения количества проб, из которых произошло успешное рекультивирование клеток после криоконсервации. Полученные результаты приведены в виде процента «жизнеспособных» проб, у которых наблюдался прирост биомассы после выращивания в течение 25 дней при температуре 30 °С и интенсивности освещения 21 мкмоль фотонов/(м²с), от общего количества замороженных проб. Замораживали по 30 проб для каждого варианта эксперимента. Проводили по 5 повторов для эксперимента.

В качестве криопротекторов были взяты различные вещества: диметилсульфоксид (ДМСО), гуммиарабик, спирты (глицерин, метанол, этанол, Д-сорбитол), сахара (декстрин, глюкоза, сахароза), аминокислоты (L-пролин). Для данных веществ ранее была показана возможность применения в качестве криопротекторов при криоконсервации у различных водорослей, преимущественно в концентрациях от 5 до 20% [5].

Результаты и их обсуждение

Было установлено, что наиболее эффективными из использованного комплекса криопротекторов оказались ДМСО, глюкоза и гуммиарабик (табл. 1, 2).



Таблица 1

Влияние концентрации криопротектора на выживаемость *S. subsalsa* PCC 9445 после 12 месяцев хранения при температуре минус 80 °С

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %			
	5	10	15	20
	Процент проб с выжившими цианеями от общего количества проб			
Без криопротектора	0,0	0,0	0,0	0,0
ДМСО	48,6 ± 0,7	68,6 ± 1,0	31,4 ± 0,3	0,0
Метанол	0,0	0,0	0,0	0,0
Глицерин	0,0	0,0	0,0	0,0
Глюкоза	40,0 ± 0,5	57,1 ± 1,1	42,8 ± 0,3	10,0 ± 1,0
Этанол	0,0	0,0	0,0	0,0
Гуммиарабик	11,4 ± 0,1	11,4 ± 0,9	0,0	0,0
Д-сорбитол	0,0	0,0	0,0	0,0
Сахароза	0,0	0,0	0,0	0,0
L-пролин	0,0	0,0	0,0	0,0
Декстрин	0,0	0,0	0,0	0,0

Таблица 2

Влияние концентрации криопротектора на выживаемость *A. platensis* PCC 9223 после 12 месяцев хранения при температуре минус 80 °С

Криопротектор	Концентрация криопротектора, %			
	5	10	15	20
	Процент проб с выжившими цианеями от общего количества проб			
Без криопротектора	0,0	0,0	0,0	0,0
ДМСО	45,5 ± 0,3	55,0 ± 1,0	45,0 ± 1,5	0,0
Метанол	0,0	0,0	0,0	0,0
Глицерин	0,0	0,0	0,0	0,0
Глюкоза	41,3 ± 0,5	59,0 ± 0,5	43,2 ± 0,5	13,0 ± 1,0
Этанол	0,0	0,0	0,0	0,0
Гуммиарабик	0,0	0,0	0,0	0,0
Д-сорбитол	0,0	0,0	0,0	0,0
Сахароза	0,0	0,0	0,0	0,0
L-пролин	0,0	0,0	0,0	0,0
Декстрин	0,0	0,0	0,0	0,0

Как видно из табл. 1 и 2, большинство соединений, рекомендуемых в качестве криопротекторов, не способствовали сохранению жизнеспособности исследуемых цианей. После криоконсервации цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 с использованием в качестве криопротекторов таких веществ, как метанол, глицерин, этанол, сахароза, Д-сорбитол, L-пролин и декстрин, рост размороженных культур во время культивирования не наблюдался. Рост культур с применением данных криопротекторов не наблюдался также и после менее длительной криоконсервации, в течение 3 и 6 месяцев.

После криохранения цианей в отсутствие криопротектора роста культур после 12-месячной криоконсервации и последующего оттаивания также не наблюдали, что совпало с данными, полученными в исследовании Muhling [6]. Такой же результат был получен и после 3 и 6 месяцев криоконсервации.

Таким образом, полученные результаты исследования не подтвердили эффективность криозащитных свойств L-пролина [1, 5], как и глицерина [2, 6], метанола [6], этанола и сорбитола [5], которые ранее были рекомендованы в качестве криопротекторов при хранении различных видов водорослей. Также результаты



исследования подтвердили то, что сахара в качестве криопротектора не была эффективной для цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223, что согласуется с данными Takano и соавт. [1].

После использования в качестве криопротекторов ДМСО, глюкозы и гуммиарабика жиз-

неспособность цианей *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 восстанавливалась с различной степенью эффективности. Так, ДМСО и глюкоза в концентрациях 5, 10 и 15% обеспечивали хорошее (41–59%) сохранение и выживаемость цианей при хранении цианей при температуре минус 80 °С (рис. 1, 2).

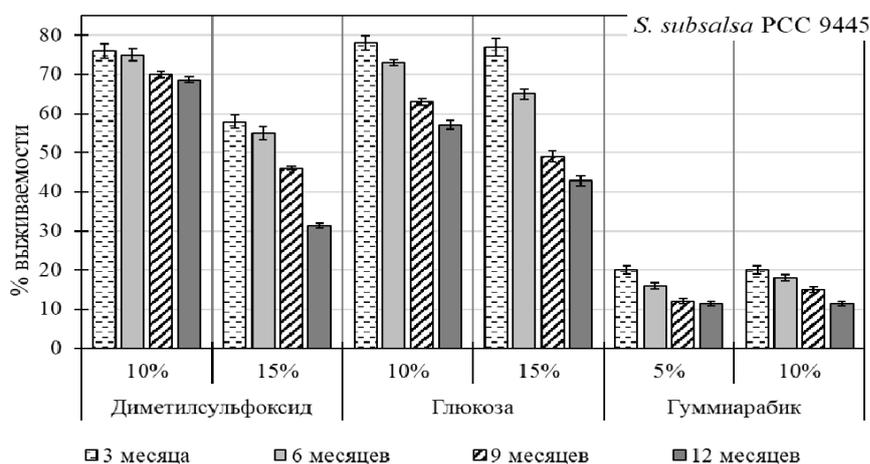


Рис. 1. Выживаемость *S. subsalsa* PCC 9445 в зависимости от срока криохранения (процент проб с выжившими цианеями от общего количества проб)

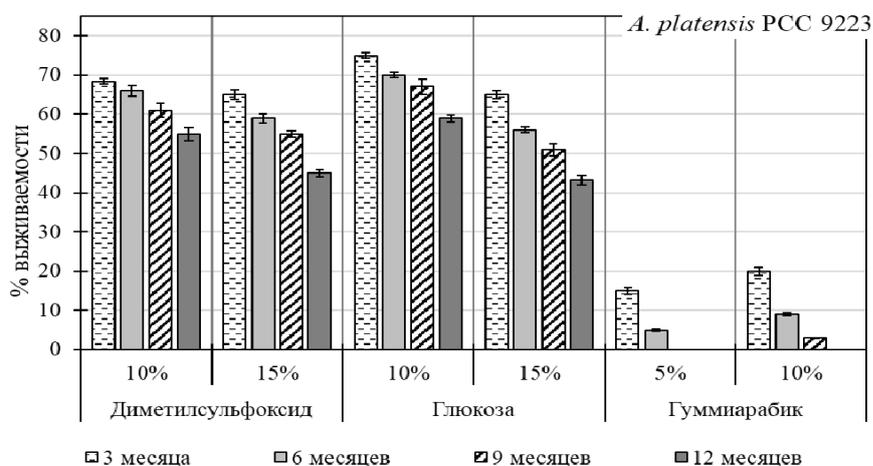


Рис. 2. Выживаемость *A. platensis* PCC 9223 в зависимости от срока криохранения (процент проб с выжившими цианеями от общего количества проб)

Тем не менее полученные результаты исследования выявили различия между двумя видами цианей, которых подвергали криоконсервации. Так, выживаемость цианей *S. subsalsa* PCC 9445 была наилучшей в присутствии ДМСО 10 %, а вот для цианей *A. platensis* PCC 9223 наилучшей выживаемости удалось достигнуть в присутствии 10 %-ной глюкозы. Однако наибольшее различие между видами цианей наблюдалось при использовании в качестве криопротектора гуммиарабика. Так, гуммиарабик при кратко-

срочной криоконсервации способствовал восстановлению исследуемых цианей, что согласуется с Takano и соавт. [1], однако не обеспечивал оптимальной выживаемости в течение всего срока наблюдения для *A. platensis* PCC 9223 (см. рис. 2), а у *S. subsalsa* PCC 9445 выживаемость составила 11,4%.

Поскольку методика криоконсервации должна быть применимой для всех исследуемых штаммов *Spirulina* и *Arthrospira*, гуммиарабик не может быть рекомендован как эффективный



криопротектор, а потому не был задействован в дальнейших исследованиях. В то же время при необходимости унифицировать методику криоконсервации как для цианеи *S. subsalsa* PCC 9445, так и цианеи *A. platensis* PCC 9223 может быть использована и глюкоза, и ДМСО. Результат такой криоконсервации будет оптимальным. Хотя для лучшего результата криоконсервации можно рекомендовать использовать для *S. subsalsa* PCC 9445 – 10%-ный ДМСО, а для *A. platensis* PCC 9223 – 10%-ную глюкозу.

Полученные результаты исследования продемонстрировали некоторые различия по выживаемости после длительной (12 месяцев) криоконсервации у двух видов цианей из близкородственных родов. Хранение осуществляли при минус 80 °С, замораживали со скоростью охлаждения в 1 °С/мин. В таких условиях защитные свойства для обоих видов цианей наиболее эффективно проявляли ДМСО и глюкоза. В то же время такие наиболее распространенные криопротекторы, как глицерин и метанол не проявляли защитные свойства. Цианея *A. platensis* PCC 9223 в присутствии 10%-ной глюкозы имела выживаемость 59,0%, а с 10%-ным ДМСО несколько ниже – 55,0%. Для *S. subsalsa* PCC 9445 была впервые определена методика криоконсервирования и приведены успешные криопротекторы и их концентрации. Так, в присутствии 10%-ного ДМСО выживаемость *S. subsalsa* PCC 9445 составляла 68,6%, а 10%-ной глюкозы – только 57,1%.

Поскольку наилучшие результаты были получены при концентрации криопротекторов 10 и 15% ДМСО и глюкозы, то именно эти концентрации могут быть взяты за основу при проведении дальнейших исследований по изучению сохранения жизнеспособности этих штаммов после оттаивания.

Полученные результаты подтверждают, что наиболее безопасной и эффективной для криоконсервации цианей считается 5–15% концентрация ДМСО [1, 2, 6, 7]. Кроме того, исследование действия химических соединений при криоконсервации показало, что наилучшие защитные свойства для *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 продемонстрировала 5–15% глюкоза, добавленная в пробы перед криохранением.

Глюкозу используют в концентрациях 3–15% для криохранения бактерий [5], в основном молочнокислых. Однако в доступной литературе отсутствуют данные об использовании глюкозы в качестве криопротектора для криоконсервации цианей *Arthrospira* sp. и *Spirulina* sp.

Заключение

Таким образом, были исследованы условия длительного низкотемпературного консервирования штаммов *Spirulina* и *Arthrospira*. Предложенная в этой работе методика – замораживание со скоростью минус 1 °С в минуту до минус 80 °С и хранение при этой температуре – обеспечивает сохранность жизнеспособности штаммов *S. subsalsa* PCC 9445 и *A. platensis* PCC 9223 в течение 12 месяцев. Исследование действия химических соединений при криохранении показало, что наилучшие защитные свойства для всех штаммов цианей продемонстрировала 5–15% глюкоза и ДМСО, добавленные в пробы перед криохранением. Отсутствие криопротектора, а также добавление в качестве криопротектора водных растворов таких веществ, как метанол, глицерин, этанол, сахароза, Д-сорбитол, L-пролин и декстрин ни для одного штамма не дали выраженного положительного эффекта. Впервые было показано, что из общеприменяемых криопротекторов подошли только глюкоза и ДМСО, кроме того, рекомендовано для штамма *S. subsalsa* PCC 9445 применение ДМСО, а для *A. platensis* PCC 9223 – раствора глюкозы.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента Российской Федерации для обучения за рубежом аспирантов российских вузов, стипендии MULTIC от международной стипендиальной программы ERASMUS MUNDUS Action 2 и стипендии Дрезденского технического университета для развития научной карьеры у женщин (Scholarship Program for the Promotion of Early-Career Female Scientists of TU Dresden).

Список литературы

1. Takano M., Sado J. I., Ogawa T., Terui G. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis* // Cryobiology. 1973. Vol. 10, iss. 5. P. 440–444. DOI: 10.1016/0011-2240(73)90073-4
2. Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastructure // Chiang Mai Journal of Science. 2012. Vol. 39, iss. 4. P. 554–561.
3. Morris G. J. Cryopreservation : An Introduction to Cryopreservation in Culture Collections Institute of Terrestrial Ecology. Cambridge : Institute of Terrestrial Ecology, 1981. 40 p.
4. Day J. G., Fleck R. A. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae // Microalgae Biotechnology. 2015. Vol. 1. P. 1–11. DOI: 10.1515/micbi-2015-0001



5. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. 2003. Vol. 46, iss. 3. P. 205–229. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
6. Muhling M. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains : dissertation. Durham, 2000. 308 p.
7. Day J. G. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria // *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol. 368 / eds. J. G. Day, G. N. Stacey. Totowa : Humana Press, 2007. P. 141–151. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2>

Образец для цитирования:

Петрухина Д. И. Низкотемпературная консервация видов Cyanophyta (*Spirulina*, *Arthrospira*) // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 1. С. 58–63. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-58-63>

Low Temperature Preservation of an Economically Important Cyanophyta Species (*Spirulina*, *Arthrospira*)

D. I. Petrukina

Daria I. Petrukina, <https://orcid.org/0000-0002-5790-9958>, Tsiolkovsky Kaluga State University, 26 Stepan Razin's Str., Kaluga 248023, Russia, daria.petrukina@outlook.com

Spirulina and *Arthrospira* cyanoprokaryota species include a wide variety of laboratory microorganism culture collections and their traditional storage by means of isolate passages does not provide long-term preservation. The rationale for this study is to evaluate the possibility of long-term low temperature storage of *Spirulina subsalsa* and *Arthrospira platensis* cyanoprokaryota. Cyanoprokaryota biomass was stored for 12 months at minus 80 °C. The cooling rate was minus 1 °C. The effects of various cryoprotectants in achieving comparatively high survival of cyanoprokaryota after long-term cryopreservation are presented in the article. It was determined that optimal cryoprotectants were 10% glucose and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions. No cryoprotection has been seen without cryoprotectant, or with methanol, glycerol, ethanol, D-sorbitol, sucrose, L-Proline, dextrin. The obtained data showed that *S. subsalsa* and *A. platensis* preserved their viability during a 12 months storage period at minus 80 °C. Thus, the present study demonstrates the possibility of preservation of cyanoprokaryota using low temperature storage at minus 80 °C. Materials of the article can contribute to applied biotechnology through the improvement of long-term storage methods for different microorganisms cultures.

Keywords: cryopreservation, storage, cyanoprokaryota, *Spirulina subsalsa*, *Arthrospira platensis*.

Acknowledgements: This work was been supported by the Russian Federation President Schol-

arships for studies abroad, ERASMUS MUNDUS Action 2 MULTIC and Scholarship Program for the Promotion of Early-Career Female Scientists of TU Dresden.

References

1. Takano M., Sado J. I., Ogawa T., Terui G. Freezing and Freeze-Drying of *Spirulina platensis*. *Cryobiology*, 1973, vol. 10, iss. 5, pp. 440–444. DOI: 10.1016/0011-2240(73)90073-4
2. Motham M., Peerapornpisal Y., Tongsriri S., Pumas Ch., Vacharapiyasophon P. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastructure. *Chiang Mai Journal of Science*, 2012, vol. 39, iss. 4, pp. 554–561.
3. Morris G. J. *Cryopreservation: An Introduction to Cryopreservation in Culture Collections Institute of Terrestrial Ecology*. Cambridge, Institute of Terrestrial Ecology, 1981. 40 p.
4. Day J. G., Fleck R. A. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae. *Microalgae Biotechnology*, 2015, vol. 1, pp. 1–11. DOI: 10.1515/micbi-2015-0001
5. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 2003, vol. 46, iss. 3, pp. 205–229. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4
6. Muhling M. Characterization of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. Diss. PhD (Biol.). Durham, 2000. 308 p.
7. Day J. G. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol. 368. Eds. J. G. Day, G. N. Stacey. Totowa, Humana Press, 2007, pp. 141–151. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2

Cite this article as:

Petrukina D. I. Low Temperature Preservation of an Economically Important Cyanophyta Species (*Spirulina*, *Arthrospira*). *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 1, pp. 58–63 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-1-58-63>