

Криоконсервирование культуры *Spirulina platensis*А.А. TSUTSAYEVA*, L.M. BALIBERDINA, A.E. ANANYINA, I.G. GRISHA
Cryopreservation of *Spirulina platensis* culture

Изучали влияние различных скоростей охлаждения на способность к пролиферации сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis*. Полученные результаты показали, что оптимальным режимом криоконсервирования культуры *Spirulina platensis* является быстрое охлаждение прямым погружением в жидкий азот суспензии клеток под защитой криопротектора диметилсульфоксида в концентрации 10%.

Ключевые слова: криоконсервирование, сине-зеленая водоросль *Spirulina platensis*, диметилсульфоксид.

Вивчали вплив різних швидкостей охолодження на здатність до проліферації синьо-зеленої водорості *Spirulina platensis*. Отримані результати показали, що оптимальним режимом криоконсервування культури *Spirulina platensis* є швидке охолодження прямим зануренням у рідкий азот з суспензією клітин під захистом криопротектора диметилсульфоксиду в концентрації 10%.

Ключові слова: криоконсервування, синьо-зелена водорість *Spirulina platensis*, диметилсульфоксид.

The impact of difference cooling rates on ability to proliferation of *Spirulina platensis* blue-green algae has been studied. Obtained results have shown that optimal condition of cryopreservation *Spirulina platensis* culture was rapid cooling by direct plunging into liquid nitrogen of metal container with cell suspension under the protection of cryoprotectant dimethyl sulfoxide in 10% concentration.

Key-words: cryopreservation, *Spirulina platensis* blue-green algae, dimethyl sulfoxide.

Сине-зеленая водоросль *Spirulina platensis* не только является объектом научных исследований, но и культивируется для использования как лечебно-профилактический компонент питания и в косметологии [1, 4, 6]. В связи с этим необходимы эффективные способы хранения чистых культур *Spirulina platensis*, при которых сохраняются исходные морфофункциональные свойства клеток.

Одним из эффективных методов долгосрочного хранения является метод хранения микроорганизмов в криоконсервированном состоянии, однако *Spirulina platensis* относится к микроводорослям, чрезвычайно чувствительным к замораживанию [3, 8].

Цель данной работы – изучение и выбор оптимальных режимов криоконсервирования культуры *Spirulina platensis*.

Материалы и методы

Объект исследования – культура *Spirulina platensis*, предоставленная Институтом ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины.

Культуру выращивали в минеральной среде Зарука [5] в колбах емкостью 250 мл при круглосточном освещении лампами дневного света в течение 7 суток при температуре 25-30 °С.

Суспензию клеток замораживали в контейнерах из нержавеющей стали емкостью 1-10 мл (мар-

Spirulina platensis blue-green algae is not only the object of scientific research but it is also cultured for use as medical-prophylactic component of food and in cosmetology. In this connection effective methods of keeping clean culture *Spirulina platensis* are necessary under which initial morphofunctional cell characteristics are preserved.

One of the effective methods of long-term storage is the one for storage of microorganisms in cryopreserved condition but *Spirulina platensis* belongs to quite sensitive to freezing microalgae [3,8].

This research aim is study and choice of optimal cryopreservation regimens of *Spirulina platensis* culture.

Materials and methods

The research object is *Spirulina platensis* culture provided by the Institute of Botany named after N.G. Kholodnyy of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The culture was grown in Zarrouck mineral medium [5] in 250 ml flasks at continuous light of day light lamps for seven days at 25-30 °С.

The suspension of cells was frozen in 1-10 ml stainless steel containers (K-4.00.00-02 and K 4.00.00-03, Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C) with cooling rate of 0.5; 5.0°C/min down to –70°C with programmable freezer

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ки К-4.00.00-02 и К 4.00.00-03, СКТЬ с ОП ИПК и К НАН Украины) со скоростью охлаждения 0,5; 5,0°C/мин до -70°C на установке программного замораживания биообъектов ЗМ1.00.00.00 (СКТЬ с ОП ИПК и К НАН Украины) с последующим погружением в жидкий азот (-196°C), а также прямым погружением контейнеров в жидкий азот (скорость охлаждения около 400°C/мин). В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (Me₂SO) в концентрациях 2, 5, 10, 20% и глицерин в концентрации 15%. Образцы отогревали на водяной бане при температуре 30°C и засеивали в среду Зарука (0,5 мл суспензии культуры в 20 мл среды) для определения способности культуры *Spirulina platensis* к пролиферации (жизнеспособности), которую оценивали визуально, фиксируя время появления зеленого пигмента, и на фотоэлектрическом калориметре ФЭК-56М (по оптической плотности). Морфологию культуры изучали под микроскопом (ЛОМО МБИ-15У42).

Статистическую обработку полученных данных проводили по методу Стьюдента-Фишера, достоверными считали различия данных при $p < 0,05$.

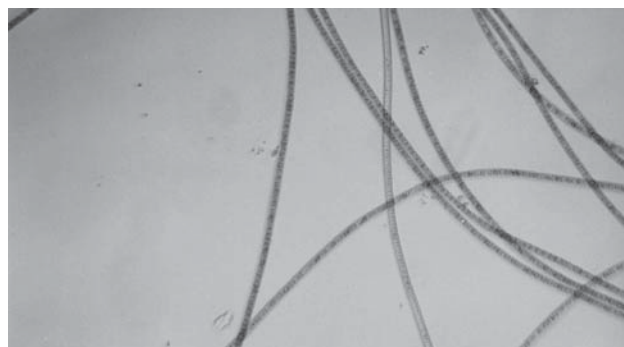
Результаты и обсуждение

После замораживания-отогрева культуры *Spirulina platensis* в среде роста без криопротектора отмечалось разделение на фрагменты разной длины и уменьшение поперечного размера подавляющего большинства нитей спирулины (рисунок). Кроме того, клетки приобретали желто-зеленую окраску (ярко-зеленая – до замораживания), что свидетельствовало о разрушении хлорофильных зерен.

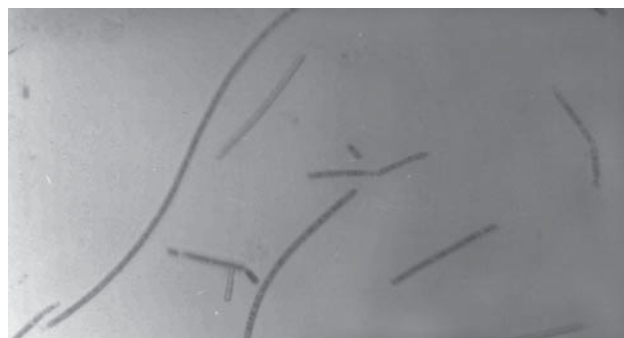
Оптическая плотность культуры после замораживания-отогрева без криопротектора по всем программам через 9 суток культивирования была достоверно ниже по сравнению с показателями оптической плотности, полученными при культивировании нативной культуры в течение 3-х суток. Скорость охлаждения культуры при замораживании без криопротектора по-разному влияла на пролиферацию клеток. При охлаждении со скоростью 0,5°C/мин первые признаки роста спирулины отмечались на 9-е сутки, при скорости охлаждения 5°C/мин и при быстром охлаждении – на 7-е сутки. На 9-е сутки пролиферативная активность *Spirulina platensis*, криоконсервированной без криопротектора, была одинаково низкой во всех вариантах охлаждения: достоверных различий в оптической плотности на 9-е сутки культивирования не отмечалось (таблица).

При использовании Me₂SO после замораживания-отогрева сохранялась структура нитей спирулины, их поперечный диаметр изменялся в меньшей степени по сравнению с клетками, заморожен-

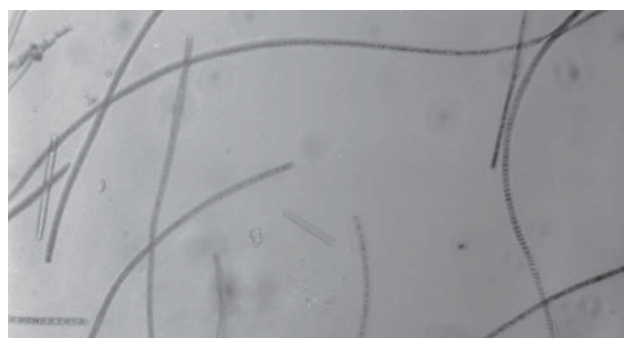
of biological objects ZM1.00.00.00 (Special Design and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C) with consequent plunging into liquid nitrogen and also direct one of the containers into liquid nitrogen (cooling rate about 400°C/min). As a cryoprotectants dimethyl sulfoxide (Me₂SO) under concentrations of 2, 5, 10, 20% and 15% glycerol solution were used. The samples were warmed on water-bath at 30°C and were inoculated in Zarrouck medium (0.5 ml culture suspension in 20 ml medium) for assessment of ability of *Spirulina platensis* culture proliferation which was visually appraise by fixing the time of green pigment



а а



б б



в в

Морфология культуры *Spirulina platensis*: а – интактная культура; б – культура после замораживания прямым погружением в азот без присутствия криопротектора и отогрева; в – культура после замораживания прямым погружением в азот в присутствии 10% Me₂SO и отогрева.

Morphology of *Spirulina platensis* culture: а – intact culture; б – culture after freezing by direct plunging in nitrogen without cryoprotectant and warming; в – culture after freezing of direct plunging in nitrogen in presence of 10% Me₂SO and warming.

ными без криопротектора, окраска незначительно отличалась от контроля. При культивировании оптическая плотность достоверно увеличивалась в 2-3 раза по сравнению с культурой, замороженной без криопротектора.

Наиболее высокую скорость роста культуры *Spirulina platensis* после замораживания-отогрева с применением Me_2SO наблюдали при использовании быстрого охлаждения.

После криоконсервирования независимо от скорости охлаждения и концентрации Me_2SO ингибировалась пролиферативная активность *Spirulina platensis* в течение 3-х суток культивирования по сравнению с контролем. При дальнейшем культивировании обнаружено достоверное отставание в накоплении биомассы образцов (в 1,5 раза), криоконсервированных под защитой 20% Me_2SO по сравнению с клетками, криоконсервированными под защитой 10% Me_2SO .

Оптическая плотность культуры *Spirulina platensis* после замораживания с различными скоростями охлаждения и концентрациями Me_2SO , отогрева и культивирования

Optical density of the *Spirulina platensis* culture after freezing with various cooling rates and Me_2SO concentrations, thawing and culturing

Скорость охлаждения, °C/мин Cooling rate, °C/min	Концентрация Me_2SO , % Me_2SO concentration, %	Продолжительность культивирования, сут Culturing, days			
		3	5	7	9
		Оптическая плотность, $x \pm Sx$ Optical density, $x \pm Sx$			
Контроль Control		0,359±0,022	0,673±0,030	0,968±0,020	1,933±0,126
0,5	Без криопротектора No cryoprotectant	—	—	—	0,158±0,010
	10	0,09±0,02	0,122±0,010	0,253±0,030	0,613±0,030 ¹
	20	—	0,087±0,010	0,15±0,01	0,25±0,01 ^{1,2}
5	Без криопротектора No cryoprotectant	—	—	0,08±0,02	0,132±0,010
	10	—	0,163±0,020	0,277±0,020 ¹	0,587±0,050 ¹
	20	—	0,09±0,01	0,153±0,010 ^{1,2}	0,323±0,030 ^{1,2}
400	Без криопротектора No cryoprotectant	—	—	0,053±0,040	0,17±0,01
	10	—	0,393±0,010	0,477±0,030 ¹	0,963±0,080 ¹
	20	—	0,183±0,030	0,31±0,01 ^{1,2}	0,56±0,04 ^{1,2}

Примечания: ¹ – статистически достоверные различия с данными по замораживанию-отогреву без криопротектора при данной скорости охлаждения, $p < 0,05$; ² – статистически достоверные различия с данными по замораживанию-отогреву в присутствии 10% Me_2SO при данной скорости охлаждения, $p < 0,05$.

Note: ¹ – statistically significant differences with the data about freeze-thawing without cryoprotectant at set cooling rate, $p < 0,05$; ² – statistically significant differences with the data about freeze-thawing at 10% Me_2SO presence at the fixed cooling rate, $p < 0,05$.

appearance, and with FEK-56 M photoelectric calorimeter (for optical density). Morphology of culture was studied under the microscope (LOMO MBI-15U42).

Obtained data were statistically processed with the Student-Fisher's method, statistically significant differences were at $p < 0.05$.

Results and discussion

After freeze-thawing of *Spirulina platensis* culture in growth medium without cryoprotectant the dividing into fragments of different length and reduction of cross-sectional dimension of the majority of spirulina strands were found (Fig.1). As well the cells gained yellow-green coloring (brilliant-green before freezing) which testified to destruction of chlorophyll grains.

Culture optical density after freeze-thawing without cryoprotectant for all programs after 9 days of culturing was significantly lower in comparison with those indices, obtained at culturing of native culture

during 3 days. Culture cooling rate during freezing without cryoprotectant differently affected cell proliferation. At 0.5°C/min cooling rate the first growth signs of spirulina were noted at the 9th day, at 5°C/min cooling rate and at rapid cooling at the 7th day. At the 9th day the proliferation activity of *Spirulina platensis* cryopreserved without cryoprotectant was identically low at all cooling variants: significant difference in optical density at the 9th culturing day was not noted (Table).

With the use of Me_2SO after freeze-thawing the structure of spirulina strands preserved, their cross-sectional dimension changed in a less extent in comparison with the cells frozen without cryoprotectant, the coloring was insignificantly differed from the control. At culturing an optical density was significantly increased in 2-3 times in comparison with the culture frozen without cryoprotectant.

The highest growth rate of *Spirulina platensis* culture after freeze-thawing with Me_2SO was observed when using of rapid cooling.

При изучении влияния криоконсервирования на культуру *Spirulina platensis* на разных сроках ее развития не установлено достоверных различий в развитии после замораживания-отогрева как 3-суточной, так и 7-суточной культуры одинаковой концентрации под защитой 10% Me₂SO: при последующем культивировании замороженной-оттаянной 3-х и 7-суточной культуры на 3-и сутки оптическая плотность составляла 0,260 и 0,270 соответственно. С практической точки зрения при необходимости создания большого запаса образцов целесообразно криоконсервировать 7-суточную культуру, так как по сравнению с 3-суточной, она дает 5-кратный прирост биомассы. Дальнейшее культивирование приводит к ослизнению культуры и сложностям в ее использовании.

Через год хранения в жидком азоте культура *Spirulina platensis*, замороженная с Me₂SO в концентрации 10%, была жизнеспособна. При посеве данной культуры после отогрева наблюдалась задержка роста на 3-4 дня по сравнению с образцами, отогретыми сразу после замораживания.

Использование в качестве криопротектора глицерина, широко применяемого в криобиологической практике [2], не дало положительных результатов при криоконсервировании спирулины, рост культуры после отогрева не наблюдался.

Выводы

Таким образом, высокая сохранность клеток культуры *Spirulina platensis* при криоконсервировании обеспечивалась замораживанием с быстрым охлаждением (прямое погружение образцов в жидкий азот) под защитой криопротектора Me₂SO в концентрации 10%. После года хранения при температуре -196°C культура *Spirulina platensis*, криоконсервированная по вышеуказанному режиму, оставалась жизнеспособной.

Литература

1. Горюнова С.В., Ржанова Г.Н., Орлеанская В.К. Синезеленые водоросли (биохимия, физиология, роль в практике). – М.: Наука, 1969. – 230 с.
2. Криоконсервирование клеточных суспензий / Под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1983. – 240 с.
3. Кузьмина Р.И., Терешкова Г.М., Нестеренко Т.В. Устойчивость синезеленых водорослей к действию низких температур и обезвоживанию // Тез. докл. междунар. симп. "Рост микроорганизмов на C₁-соединениях". – Пушино, 1977. – С. 131.
4. Микаладзе Г.Т., Мески Р.Г., Завьялов Ю.Ф. и др. Использование биомассы спирулины в пищевых целях совместно с высшими растениями // Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах. – Киев: Наук. думка, 1979. – С. 38-43.
5. Пиневиц В.В., Верзилин Н.Н., Михайлов А.А. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта для высокоинтенсивного культивирования // Физиология растений. – 1970. – Т. 17, Вып. 5. – С. 1037-1046.

After cryopreservation independently on cooling rate and Me₂SO concentration *Spirulina platensis* proliferation activity was inhibited during 3 days' culturing in comparison with the control. During subsequent culturing there was found statistically significant delay in accumulation of biomass of the samples (in 1.5 time) cryopreserved under protection of 20% Me₂SO if compared with the cells cryopreserved with 10% Me₂SO protection.

When investigating the cryopreservation effect on *Spirulina platensis* culture at different terms of its development there were no found statistically significant differences in development after freeze-thawing of both 3 days' and 7 days' cultures of similar concentrations under protection of 10% Me₂SO: during subsequent culturing to the 3rd day an optical density made 0.260 and 0.270 correspondingly. From practical point of view, if necessary to create the big stock of samples it is expedient to cryopreserve the 7 days' culture, since if compared with 3 days' one it gives 5-fold increment of biomass. Further culturing leads to culture sliming and problems in its using.

One storage year later the *Spirulina platensis* culture frozen with 10% Me₂SO in liquid nitrogen, was viable. During inoculation of this culture after thawing there was observed growth delay by 3-4 days if compared with the samples warmed just after freezing.

Glycerol use as a cryoprotectant, which is widely applied in cryobiological practice [2], did not provide positive results during cryopreservation of spirulina, culture growth after thawing was not observed.

Conclusions

Thus, high survival of *Spirulina platensis* culture cells during cryopreservation was provided by freezing with rapid cooling (direct plunging of samples into liquid nitrogen) under cover of Me₂SO cryoprotectant in 10% concentration. One storage year later at -196°C *Spirulina platensis* culture cryopreserved according to above mentioned regimen remained alive.

References

1. Gorunova S.V., Rzhanova G.N., Orleanskaya V.K. Blue-green algae (biochemistry, physiology, role in practice). – Moscow: Nauka, 1969. – 230 p.
2. Cryopreservation of cell suspensions / Ed. by A.A. Tsutsayeva. – Kiev, Naukova dumka, 1983. – 240 p.
3. Kuzmina R.I., Tereshkova G.M., Nesterenko T.V. Stability of blue-green algae to action of low temperature and dehydration // Proc. of Reports of International symposium "Growth of microorganisms on C₁-compounds". – Puschino, 1977. – P. 131.
4. Mikaladze G.T., Meski R.G., Zavyalov Yu.P. et al. Using biomass of spirulina in food together with highest plants // Role of lower organisms in cycling of closed ecologic systems. – Kiev: Naukova dumka, 1979. – P. 38-43.

6. Mitsuo T., Sado J.-I., Ogawa T., Terul G. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis* // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N5.– P. 440-444.
7. Morgan H.C., Moorhead K.J. Spirulina – nature's superfood.– London: Nutrex, 1993. – 152 p.
5. Pinevich V.V., Verzilin N.N., Mikhaylov A.A. Study of *Spirulina platensis* – new object for high-intensity cultivation // Fiziologiya rasteniy.– 1970.– Vol. 17, Issue 5.– P. 1037-1046.
6. Mitsuo T., Sado J.-I., Ogawa T., Terul G. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis* // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N5.– P. 440-444.
7. Morgan H.C., Moorhead K.J. Spirulina – nature's superfood.– London: Nutrex, 1993. – 152 p.

Поступила 21.07.2006

Accepted in 21.06.2006