



<https://doi.org/10.15407/cryo35.02.057>

УДК 57.086.13:602:582.263

**Н.А. Чернобай<sup>1,2\*</sup>, А.П. Герілович<sup>1,3</sup>, Н.О. Шевченко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,  
м. Харків, Україна

<sup>2</sup> Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М.С. Бокаріуса»,  
м. Харків, Україна

<sup>3</sup> Приватна наукова установа «Науково-дослідний інститут єдиного здоров'я»,  
м. Харків, Україна

\*nadiiachernobai@gmail.com

## **БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ МІКРОВОДОРОСТЕЙ: МЕТОДИ ЗБЕРІГАННЯ ТА НЕКРІОГЕННІ ЧИННИКИ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ**

*В огляді розглянуто перспективи використання та методи збереження колекційних зразків мікроводоростей, які мають значний біотехнологічний потенціал у харчовій, фармацевтичній, екологічній та енергетичній галузях. У роботі проведено аналіз та узагальнено сучасні методи підтримання культур мікроводоростей з фокусом на їхню стабільність, збереження біологічних властивостей та можливості довгострокового зберігання. Дослідження охоплює порівняння різних підходів до збереження мікроводоростей, зокрема серійне субкультивування, ліофілізацію та кріоконсервування. Особливу увагу приділено кріоконсервуванню як ефективному методу довготривалого зберігання генетично стабільних культур, що дозволяє мінімізувати втрати цінних біотехнологічних характеристик. Визначено вплив стадії розвитку культури, концентрації клітин у суспензії, холодової адаптації, центрифугування на виживаність мікроводоростей після кріоконсервування. Отримані результати мають важливе значення для розвитку біотехнологічних та екологічних програм, пов'язаних з використанням мікроводоростей.*

**Ключові слова:** мікроводорості, біотехнологія, кріоконсервування, ліофілізація, культивування, адаптація.

Мікроводорості мають значне географічне та екокліматичне поширення в світі, а також характеризуються високим рівнем дивергенції біологічних та генетичних властивостей, різним потенціалом витривалості в агресивних середовищах (описано понад 70 тисяч видів з різною витривалістю до дії рН, температури та солоності). Значне їхнє видове розмаїття та спроможність до синтезу біологічно активних речовин робить їх перспективним об'єктом досліджень у сферах біотехнології, харчової та переробної промисловості, медицини, сіль-

ського господарства, косметології, виробництва енергетичних субстратів, розвитку «зелених технологій», органічного виробництва. Також вони можуть бути цінним модельним організмом для дослідження токсичності.

Мікроводорості — це група різноманітних фотосинтезуючих мікроорганізмів (ціанобактерії, діатомові, одноклітинні зелені та деякі інші види водоростей), які населяють ґрунти, прісні й солоні водойми, та є невід'ємною частиною як помірно-традиційних, так і екстремальних біоценозів. Ці мікроорганізми можуть

Цитування: Чернобай НА, Герілович АП, Шевченко НО. Біотехнологічний потенціал мікроводоростей: методи зберігання та некріогенні чинники ефективності кріоконсервування. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(2): 57–68. <https://doi.org/10.15407/cryo35.02.057>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

ISSN 2307-6143. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025. Т. 35, № 2

розвиватись у складних агрокліматичних умовах і продукувати низку корисних у біотехнології сполук: ліпіди, білки, вуглеводи, гормони, вітаміни, флавоноїди та інші. Вони є також джерелом індикаторних та біоактивних пігментів [2, 3, 9, 11, 14, 30, 32, 40, 55, 56, 64, 65, 67, 73]. Особливу зацікавленість викликає використання мікроводоростей як організмів, здатних акумулювати сонячну енергію у процесі фотосинтезу, оскільки ефективність перетворення ними енергії значно вища, ніж вищими рослинами [2, 4, 64]. Також їхня здатність поглинати вуглецевий діоксид з атмосфери та виділяти водень має потенціал у зменшенні парникових газів та отриманні альтернативної енергії [35].

Дослідження мікроводоростей, зокрема екстремотолерантних та екстремофільних видів, відкриває нові горизонти для розвитку біотехнологічних підходів та нових сфер їхнього застосування. Сучасні дослідження фокусуються на екологічній адаптації та вивченні потенціалу використання мікроводоростей у біотехнології, підкреслюючи їхню здатність до продукування біологічно активних сполук в умовах стресу [15]. У роботі Р. Leão зі співавторами [44] зазначено, що екстремофільні мікроводорості можуть значно збільшити виробництво біомаси, зменшити ризики забруднення довкілля у великомасштабних системах за рахунок біорозкладання контамінантів органічного походження. Це свідчить про те, що екстремофільні мікроводорості мають значні перспективи застосування в харчовій, фармацевтичній, косметичній та біопаливній промисловостях, пропонуючи стійкі та ефективні альтернативи традиційним ресурсам [64].

Наразі описано морфологічні ознаки понад 72500 потенційних видів мікроводоростей, з яких за молекулярно-генетичними профілями ідентифіковано приблизно 30000 [28]. Їхнє застосування з промисловою, медичною та екологічною метою можливе лише завдяки унікальним, генетично запрограмованим характеристикам цих біологічних об'єктів [29, 35, 55]. Про важливість стабільного довгострокового збереження культур мікроводоростей у вихідному стані (без фенотипових та генотипових видозмін) свідчить їх промислове використання. Це пов'язано з тим, що генетичні зміни можуть призвести до спотворення продуктивності та

біологічної активності цих мікроорганізмів, а це, у свою чергу, викликає втрату їхньої біотехнологічної цінності [43]. Біотехнологи розробили різні методи збереження мікроводоростей, зокрема серійне субкультивування, ліофілізацію та кріоконсервування [28].

Мета дослідження — аналіз сучасних підходів до біотехнологічного використання мікроводоростей, вивчення методів зберігання колекційних зразків, а також оцінка впливу некріогенних факторів на ефективність кріоконсервування. У роботі особлива увага приділена ролі фізіологічного стану клітин та підготовчих процедур у підвищенні життєздатності деконсервованих мікроводоростей.

**Застосування мікроводоростей у біотехнології.** До найбільш вивчених родів належать мікроводорості *Arthrospira*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Coccomyxa*, *Dunaliella* і *Galdiera*. Біохімічний склад мікроводоростей варіюється залежно від роду та виду. Особливо важливим аспектом біотехнології є виробництво  $\beta$ -каротину, жовтого терпеноїдного пігменту, попит на який зростає у зв'язку з широким спектром застосування на ринку [31, 58, 63]. Серед відомих продуцентів  $\beta$ -каротину треба відзначити зелену водорість *Dunaliella salina*. Цей вид вирізняється надзвичайною галотолерантністю. Водорість зростає в морському середовищі та внутрішніх солоних озерах, що робить її найбільш галотолерантним еукаріотом, виявленим на сьогодні [37]. Обсяг продукції каротиноїдів може досягати концентрації до 14 % від сухої маси, крім того мікроводорості роду *Dunaliella* містять астаксантин і кантаксантин [11, 16, 32, 39]. До каротинсинтезуючих мікроводоростей належить прісноводний психрофільний вид *Mesataenium berggrenii*, клітини якої синтезують  $\beta$ -каротин, неоксантин, віолоксантин, лютеїн, зеаксантин, але не  $\alpha$ -каротин. Використання каротиноїдів мікроводоростей як текстильних барвників розширило біотехнологічний потенціал обох видів за межі харчової промисловості. Це підкреслює актуальність досліджень екстремофільних мікроорганізмів та ілюструє їхнє багатообіцяюче застосування в різних галузях промисловості.

Використання біомаси мікроводоростей у харчовій промисловості стикається з кількома проблемами, зокрема необхідністю дотримання суворих державних норм щодо безпеки харчо-

вих продуктів, високими виробничими витратами, масштабованістю процесів та їхнім сприйняттям споживачами [34]. Подолання цих перешкод вимагає значних зусиль у сфері біотехнологічних досліджень.

Важливим аспектом застосування мікрободоростей є їхні антагоністичні, протимікробні та пестицидні властивості. Це зумовлює перспективи їхнього використання у галузі контролю шкідників з дотриманням стандартів органічного виробництва у харчовій та переробній промисловості, сільському господарстві та охороні здоров'я [9, 67].

Перспективним напрямом використання мікрободоростей є розбудова систем гарантування екологічної безпеки. Польові випробування показали, що мікрободорості у промислових басейнах можуть видаляти до 99 % розчинених і твердих частинок металів [25]. Слід зазначити, що на очисні споруди припадає приблизно 15 % від загальних 6,4 тонн кадмію, які щорічно потрапляють у водне середовище. Кадмій — важкий метал, який є важливим контамінантом навколишнього середовища, відомим своєю високою токсичністю навіть у низьких концентраціях. Але є дослідження, у яких описано, що екстремофільна зелена мікрободорість *Chlamydomonas acidophila* має толерантність і здатність до секвестрування кадмію у своїх вакуолях, що підкреслює її значущість у фітореMediaції водних ресурсів, забруднених важкими металами [6, 7, 60].

Дослідники також вважають мікрободорості джерелом біогазів та інших типів біопалив, що зумовлює їхню біотехнологічну перспективність у сегменті «зелених технологій» [6, 7, 13]. Одним з найбільших викликів сучасних біотехнологій є розробка ефективних і рентабельних систем для виробництва та отримання енергії з мікрободоростей, що потребує підвищення продуктивності та ефективності утилізації виробленої біомаси [14].

Широке розмаїття застосування екстремофільних та екстремотолерантних мікрободоростей може сприяти створенню екологічно чистих продуктів: біопаливу, біопластику, косметичних засобів, біодобрив. Інвестиція у дослідження і біотехнологічні розробки на основі мікрободоростей та їхніх продуктів є перспективною для розвитку багатьох галузей та покращення стандартів екологічної безпеки [64].

З метою забезпечення біотехнологічної цінності штамів і культур мікрободоростей необхідно глибоке та всебічне дослідження їхніх біологічних властивостей. Крім селекції продуцентів корисних речовин, важливим є збереження та стабільність характеристик їхньої продуктивності під час постійного культивування та зберігання мікроорганізмів. Важливими є визначення та паспортизація біологічних особливостей виробничих штамів та клонів, їх біотехнологічно перспективних ознак, а також збір доказів щодо стабільності цих характеристик у пасажах [59].

### СПОСОБИ ЗБЕРІГАННЯ КОЛЕКЦІЙНИХ ЗРАЗКІВ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

Найвідомішими колекціями, які містять штамми мікрободоростей є: заснована в 1947 р. колекція культур водоростей і найпростіших в Університеті Кембриджу (Велика Британія); заснована в 1976 р. колекція культур водоростей в Університеті Штату Техас (США), заснована в 1953 р. колекція Геттінгенського університету (Німеччина), а також заснована в 1979 р. колекція водоростей при Лабораторії Альгології (Чеська Республіка) [8].

Найпоширенішим способом збереження культур мікрободоростей є постійне утримання зразків у контрольованих умовах навколишнього середовища. Звичайний серійний пересів проводиться з використанням асептичної мікробіологічної техніки та включає перенесення інокуляту з пізньої стаціонарної фази культури до свіжого поживного середовища [3]. Це забезпечує підтримання культури в метаболічно активному стані. Метою зберігання колекційних культур є підтримання здорової фізіологічно, морфологічно, генетично та біохімічно однорідної популяції. Необхідно враховувати, що різний вік субкультур може характеризуватися різними стадіями життєвого циклу того чи того виду (наприклад, на додаток до зелених рухливих клітин, які діляться на етапі ранньої стаціонарної фази у культурах *Haematococcus pluvialis* Flowtow присутні помаранчеві / червоні апланоспори) [56].

Основними обмеженнями постійного пересівання культур мікрободоростей є селективне та штучне походження поживного середовища, режимів інкубації з огляду на їхні екологічні особливості. Культивування за лабора-

торних умов може призвести до втрати важливих біологічних і біотехнологічних ознак. Приклади нестабільності включають зменшення розміру гілок діатомових водоростей, зміни у морфологічній структурі *Micractinium pusillum* Fresenius, втрату нормального пігментного складу в багатьох водоростях [5]. Додаткові обмеження включають можливість контамінації та інфікування первинної (аксенової) культури, неправильного маркування або інших помилок, які можуть трапитися під час постійних маніпуляцій зі стерильними зразками [27]. Дослідження показали, що постійне субкультивування водоростей з різних таксономічних груп призводило до низки серйозних фенотипових змін і втрати здатності виробляти комерційно значущі метаболіти [23], що, ймовірно, пов'язано зі зміною факторів мікрооточення та можливими генетичними перебудовами.

При безперервному культивуванні з часом можуть різко змінюватися умови, навіть якщо зовнішнє середовище залишається незмінним і культура водоростей не вичерпала жодної необхідної поживної речовини. Наприклад, часто змінюється рН, якщо немає відповідного буфера, деякі поживні речовини окислюються або іншим чином поступово змінюються, особливо під час надмірного освітлення [73]. Крім того, звичайне серійне субкультивування є трудомістким і економічно обтяжливим процесом, який обмежує можливість постійно підтримувати велику кількість колекційних зразків та вести декілька ліній мікроорганізмів одночасно. Існують також ризики міжлінійної контамінації та втрати чистих культур. Аби мінімізувати ці ризики звичайного субкультивування вегетативних форм, були розроблені альтернативні підходи до стратегії збереження *ex situ* культур водоростей і ціанобактерій, зокрема ліофілізація та кріоконсервування.

Ліофілізація мікроводоростей включає три фази: заморожування, первинне та вторинне сушіння [29]. Культуру клітин спочатку піддають впливу температур близько  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  у фазі заморожування, потім піддають вакуумній сушці за цієї температури впродовж 2 годин, щоб викликати сублімаційне видалення вологи, наприкінці проводять додаткове зневоднення у фазі вторинного сушіння шляхом підвищення температури до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Весь процес завершується заміною атмосфери інертними газами, таки-

ми як азот [38]. Збережені таким чином культури є стабільними за кімнатної температури впродовж періоду зберігання до 5 років, мають високу стійкість до бактеріального та грибового забруднення завдяки низькому вмісту вологи [18]. Крім того, зразки мають невеликий коефіцієнт об'єму, необхідний для ліофілізованих культур, ефективно використовуються ресурси за рахунок зменшення простору для зберігання, споживання енергії, витрат на транспортування.

W. Daily і J. McGuire [21] заклали основу для збереження мікроводоростей шляхом ліофілізації 32 видів мікроводоростей, з яких життєздатність спостерігалася для 24. Досліджуючи збереженість мікроводоростей після ліофілізації, O. Holm-Hansen у 1963 р. провів паралельну роботу з кріоконсервуванням зразків. Науковець визначив вплив швидкості охолодження та температури зберігання на життєздатність деконсервованих культур. Так, було показано, що для більшості культур мікроводоростей ефективними виявилися повільні швидкості охолодження та температури зберігання не вище  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  [36]. Це було перше в історії дослідження, пов'язане з кріоконсервуванням мікроводоростей, яке дозволило отримати життєздатну культуру синьозелених *Nostoc muscorum* після 5 років зберігання. Важливість цього відкриття полягає в тому, що це був найдовший період зберігання, коли-небудь досягнутий на той час для ціанобактерій. Але для зелених еукаріотичних мікроводоростей життєздатність на перших етапах кріобіологічних досліджень не перевищувала 1–5 % [51]. Отже, починаючи з 70-х років ХХ століття дослідження з довгострокового зберігання були направлені на розробку технологій кріоконсервування мікроводоростей.

## **КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ СПОСІБ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО СТАБІЛЬНИХ ЗРАЗКІВ КУЛЬТУР ТА ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ МІКРОВОДОРОСТЕЙ**

Кріоконсервування — це технологія, яка наразі застосовується для збереження біологічних об'єктів у життєздатному стані протягом тривалого часу при кріогенних температурах, зазвичай від  $-80$  до  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . За цих температур

підтримується стан, у якому будь-яка біологічна активність, включаючи біохімічні реакції, які могли б призвести до загибелі клітини, ефективно зупиняється [40, 41, 68]. Основна задача будь-якої стратегії збереження полягає у тому, аби гарантувати репрезентативність організму відносно його оригінальних форм, наскільки це можливо, без змін у біологічних характеристиках [20, 23, 24].

Протягом останніх 40 років центрами біологічних ресурсів та біотехнологіями розробляються методи кріоконсервування мікрободоростей. Здебільшого це стосується ціанобактерій, а щодо багатьох таксонів еукаріотичних водоростей кріоконсервування або взагалі не застосовувалося, або не дозволяло отримувати високий рівень життєздатності деконсервованих зразків [22, 69].

Деякі мікрободорості, особливо ціанобактерії, можуть зберігатися в замороженому стані при неконтрольованому охолодженні шляхом прямого поміщення зразків до морозильних камер за температур від  $-20$  до  $-70$  °C [31]. Однак, за даними деяких дослідників [28, 42], термін зберігання усіх досліджених мікрободоростей у таких умовах не перевищує місяця. Максимальний термін зберігання джугутикових водоростей, таких як *Chlorella minutissima*, *Chlorella stigmatophora*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, при додаванні 5—10 % ДМСО або метилового спирту, не перевищує 5 діб, а без додавання кріопротекторів вони втрачають свою життєздатність протягом декількох годин [70]. У роботі К. Возовик зі співавт. [1] показано, що зберігання *Chlorococcum dissectum* неможливе в умовах побутової морозильної камери (за температури  $-18$  °C): уже через 24 години життєздатні клітини були повністю відсутні. За умов поміщення клітинної суспензії цієї мікрободорості у морозильні камери за  $-40$  та  $-70$  °C спостерігали значуще зниження здатності її клітин до утворення колоній, середньострокове зберігання колекційних зразків можливе терміном не довше 20 діб. Можливо, рекристалізація льоду та/або внутрішньоклітинна хімічна активність спричиняють поступове зниження рівня життєздатності, таким чином багато штамів втрачають життєздатність протягом декількох днів зберігання за низьких від'ємних температур.

Хімічна активність та ріст кристалів на етапі охолодження практично припиняються при

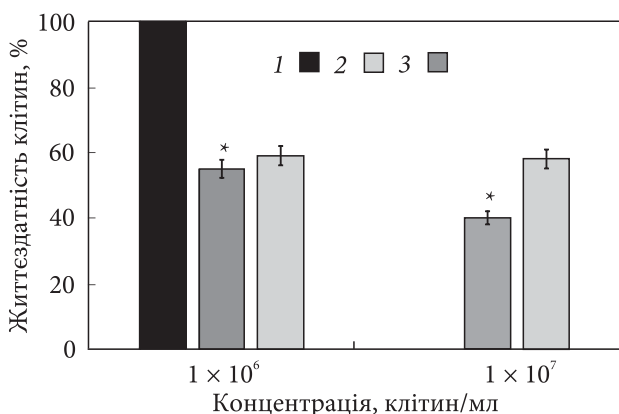
температурах нижче  $-130$  °C [28]. Прийнято вважати, що популяція живих організмів здатна пережити процеси охолодження-нагрівання, може зберігатися без суттєвої втрати життєздатності протягом невизначеного часу при температурах нижче точки склування [47]. Існує досить мало емпіричних даних з довгострокового низькотемпературного зберігання мікрободоростей. Показано, що бактерії та гриби можуть зберігати високу життєздатність після 30 років безперервного кріозберігання [21, 24]. Більшість видів мікрободоростей, навіть за високого рівня збереженості безпосередньо після етапу охолодження-нагрівання, нежиттєздатні після року знаходження за температури рідкого азоту [28].

Існує низка критичних факторів (тих, що забезпечують життєздатність у процесі зберігання та відновлення повної функціональності після нього), які можуть вплинути на результат кріоконсервування, і вони відрізняються залежно від організму [21, 24, 69]. Некріогенні параметри до та після низькотемпературного зберігання (вік культури, концентрація клітин у ній, температура культивування, осмотичний потенціал та склад середовища росту/відновлення) можуть впливати на життєздатність так само, як і кріогенні параметри (композиція кріопротекторної суміші, режими охолодження та відтавання) [21, 24, 33]. Тому розробка ефективних протоколів кріоконсервування повинна включати детальну оцінку таких факторів.

### **ВПЛИВ СТАДІЇ РОСТУ КУЛЬТУР МІКРОВОДОРостей ТА КОНЦЕНТРАЦІЇ КЛІТИН НА ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПІСЛЯ ОХОЛОДЖЕННЯ-НАГРІВАННЯ**

Для отримання високих показників життєздатності клітин мікрободоростей необхідно враховувати низку специфічних показників — наприклад, вік культури.

Інтактні культури в активній фазі росту (рання стаціонарна), як правило, демонструють більш високі показники життєздатності ніж ті, що перебувають у пізній стаціонарній фазі чи фазі занепаду. Водночас було виявлено, що вік культури клітин мікрободоростей є важливим фактором, що впливає на ефективне кріоконсервування багатьох видів. З 17 штамів роду



Життєздатність деконсервованих клітин мікроводорості *D. salina* після охолодження до температури рідкого азоту залежно від початкової концентрації клітин у суспензії на середовищах Ramaraj та 4 M Ramaraj (зі збільшеною концентрацією хлориду натрію). 1 — контроль, 2 — середовище Ramaraj, 3 — середовище 4 M Ramaraj

*Chlorococcales*, 11 показали високу життєздатність після нагрівання, коли використовували клітини на стаціонарній фазі росту [49]. Аналогічні результати були отримані для 5 видів морських мікроводоростей та для прісноводної *Chlorella vulgaris*. Більший рівень життєздатності спостерігали у деконсервованих культурах, які були на стаціонарній фазі росту перед охолодженням [53]. Це може бути пов'язано з тим, що старі культури часто не мають вакуолей, при цьому у клітинах збільшується вміст ліпідів, вуглеводів та інших високомолекулярних речовин, що, ймовірно, сприяє кращим результатам криоконсервування зразків [49].

Процедури криоконсервування водоростей зазвичай не передбачають певної щільності клітин у культурі під час заморожування. Аналіз даних літератури, опублікованих до 2000-х років показав відсутність такої інформації. Але у сучасних статтях показано, що ефективність криоконсервування більшості видів залежить від концентрації клітин у культурі. Показано відсутність значущої різниці за життєздатністю деконсервованих зразків зелених мікроводоростей при концентрації від  $1$  до  $10 \times 10^6$  кл/мл. Збільшення їхньої кількості до  $20$ — $50 \times 10^6$  кл/мл призводило до значущого зменшення досліджуваного показника. Наразі це пояснюється тим, що під час процесу заморожування та/або відтавання у середовище з клітин вивільняються одна або кілька специфічних речовин, які знижують життєздатність де-

консервованої культури [12, 57]. Токсичні речовини, ймовірно, вивільняються з клітинних стінок внаслідок ферментативних процесів. Це припущення доведено, по-перше, тим, що під час криоконсервування штамів з відсутньою клітинною стінкою не спостерігали залежності між кількістю клітин у зразку та життєздатністю. По-друге, якщо у клітинну суспензію до етапу охолодження додавали екстракт, отриманий з пошкоджених внаслідок багаторазового занурення зразків у рідкий азот культур з клітинною стінкою, то після нагрівання вони демонстрували дуже низьку кількість життєздатних мікроводоростей [12].

Попередні дані, отримані за допомогою гел'єхромографії, вказують на те, що шкідливі речовини, які виділяються клітинами до поживного середовища на етапах криоконсервування, є невеликими (молекулярна маса  $<1,5$  кДа), водорозчинними, термостабільними, органічними сполуками [60].

Проведені нами дослідження показали, що ефективність криоконсервування клітин галотолерантної мікроводорості *D. salina*, яка не має жорсткої клітинної стінки, залежить як від умов культивування, так і їхньої концентрації у суспензії (рисунок). За концентрації  $1 \times 10^6$  кл/мл рівень їхньої виживаності був вищим у культурі, яку вирощували у живильному середовищі Ramaraj [61] порівняно з варіантом, коли концентрація становила  $1 \times 10^7$  кл/мл відповідно. За умов культивування клітин у цьому середовищі зі збільшеним вмістом хлориду натрію (до 4 M) концентрація клітин значуще не впливала на рівень збереженості деконсервованих зразків. Погіршення показника збереженості може бути пов'язано зі збільшенням щільності клітин, що призводить до нерівномірного заморожування та утворенням льоду, оскільки скупчення клітин може спричинити формування великих кристалів льоду, які пошкоджують клітинні стінки змінами в осмотичних умовах під час охолодження.

Можна зробити висновок, що оптимальна концентрація клітин деяких видів перед охолодженням є важливим фактором для підвищення їхньої виживаності після нагрівання. Це варто враховувати під час збереження колекційних зразків мікроводоростей для подальшого використання у біотехнології, харчовій промисловості тощо.

## РОЛЬ ХОЛОДОВОЇ АДАПТАЦІЇ КЛІТИН МІКРОВОДРОСТЕЙ ДЛЯ РОЗРОБКИ ЕФЕКТИВНИХ МЕТОДІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Здатність водоростей пристосовуватися до екстремальних умов сформувалася в ході еволюції. Останні метаболічні дослідження свідчать, що рослини розробили різноманітні стратегії для перебудови свого метаболізму в стресових умовах, проте повний спектр механізмів їхньої адаптації залишається недостатньо вивченим [19, 45].

Клітинні реакції, які хлорофіти та інші мікроорганізми використовують для виживання за низьких температур, активно досліджуються лише останніми роками, переважно на психрофільних видах [17, 46]. Очевидно, що для різних груп водоростей існують спільні генетично обумовлені захисні механізми, які активуються у відповідь на стрес. Завдяки цим механізмам вони здатні витримувати короткочасний вплив несприятливих хімічних і фізичних умов, зокрема низьких температур [48, 65]. Наші результати показали, що за дії холодового стресу на культуру клітин *Dunaliella salina* відбувається накопичення каротиноїдів та ліпідних глобул, що підвищує ефективність кріоконсервування цієї мікроводорості [15].

До основних процесів адаптації належать синтез каротиноїдів, продукування білків холодового шоку та активація пентозофосфатного шляху [26, 66]. Водночас навіть короткочасне зниження температури до 3 °C може виявитися летальним для вегетативних клітин синьо-зелених водоростей *Anacystis nidulans* і *Chlamydomonas reinhardtii* [62, 71]. Повідомлялося, що нитчаста зелена водорість *Cladophora sauteri* не здатна адаптуватися до холоду, оскільки екологічна ніша її поширення — це водойми, у яких температура не опускається нижче 10 °C та не піднімається вище 25 °C [23]. Інші водорості (наприклад, *Haematococcus pluvialis*) демонструють здатність переносити висихання та низькі температури (4–8 °C) протягом свого нормально-го життєвого циклу. Стійкість до заморожування прісноводної водорості *Klebsormidium flaccidum* значно підвищувалася завдяки холодовій адаптації при 2 °C протягом 2–7 діб. Життєздатність клітин після дії знижених температур (від –10 °C) при цьому складала 55 та 85 % відповідно до кількості діб акліматизації, що зна-

чуще перевищувало показник життєздатності (10 %), отриманий від культури, яку було вирощено за 18 °C [54]. Біохімічні зміни, що супроводжують стійкість до заморожування, включають накопичення розчинних вуглеводів, амінокислот, глікозидів, а також зміну кількості та розміру крохмальних зерен у хлоропластах, зменшення розміру вакуолі та збільшення розміру та кількості хлоропластів і цитоплазматичного простору [23, 72]. Культивування в неакліматизаційних умовах або умовах, що сприяють деакліматизації, навпаки, може призвести до зниження кріотолерантності.

Таким чином, здатність мікроводоростей переносити низькі температури визначається їхніми таксономічними особливостями та морфофункціональними характеристиками. Дослідження впливу холоду та інших стресових факторів на окремі види водоростей є надзвичайно актуальним, оскільки, з одного боку, це може сприяти підвищенню продукції корисних метаболітів, а з іншого — допомогти уникнути загибелі клітин у культурі через надмірно суворі умови. Як свідчать джерела літератури, дослідниками була показана важливість культивування водоростей за субоптимальних температур (акліматизація до холоду), яка приводила до кращих показників життєздатності клітин після охолодження-нагрівання як прісноводних [52], так і морських мікроводоростей [10]. Зокрема, G. Morris [50] припустив, що високий рівень життєздатності загартованих зразків після розморожування може бути наслідком збільшення відсотку ненасичених жирних кислот у складі мембранних фосфоліпідів.

Таким чином, холодова адаптація більшості водоростей впливає на їхню стійкість до низьких температур, що може бути використано для покращення результативності та ефективності кріоконсервування.

## ЦЕНТРИФУГУВАННЯ КЛІТИН МІКРОВОДРОСТЕЙ ЯК ОДИН З ЕТАПІВ ПІДГОТОВКИ ДО КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Як один з етапів підготовки зразків до кріоконсервування треба розглядати метод седиментації для концентрування біомаси клітин. У лабораторних умовах це осадження клітин відбувається методом центрифугування. Зразки багатьох мікроводоростей можуть бути центрифуговані, або, як у випадку з нитко-

подібними таксонами, таломі можуть бути розділені перед обробкою кріопротектором [23]. Внесок цих підготовчих кроків дослідниками часто не береться до уваги. При цьому, звичайна практика концентрування культур шляхом центрифугування перед заморожуванням та/або видалення кріопротекторів шляхом осадження клітин перед заміною супернатанту свіжим середовищем може спричинити значний стрес для клітин мікроводоростей. Хоча не було показано, що підготовчі етапи викликають летальні стреси, вважається, що вони можуть зробити організм більш чутливим до кріоконсервування [22], оскільки центрифугування створює певні сили зсуву, які можуть пошкодити клітини водоростей після нагрівання, коли вони ще дуже вразливі [72]. У роботі G. Morgis [52] було показано, що виключення етапу центрифугування деконсервованих зразків підвищувало життєздатність клітин на ~22 % у випадку коли у культурі було  $1 \times 10^6$  кл/мл та не впливало на досліджуваний показник при  $50 \times 10^6$  кл/мл. Частково це може бути пов'язано з процесами обробки, зокрема з адгезією клітин до наконечника піпетки та мікроцентрифужних пробірок, що відчутніше саме при нижчих концентраціях. Тому, під час розробки протоколу кріоконсервування, який передбачає використання висококонцентрованих розчинів кріопротекторів, що потребують етапу відми-

вання, необхідно враховувати результати, описані у зазначеній роботі.

## ВИСНОВОК

Результати аналізу літературних даних щодо біотехнологічного використання мікроводоростей показує на їхню цінність для харчової, фармацевтичної, косметичної та біопаливної промисловості, пропонуючи стійкі та ефективні альтернативи традиційним ресурсам.

Збереження біологічних характеристик, фізіологічна, генетична стабільність та тривале зберігання корисних і прогнозованих біотехнологічних властивостей мікроводоростей можуть бути забезпечені кріоконсервуванням.

Дослідження показують, що ефективність низькотемпературного зберігання залежить від віку культур, концентрації клітин у зразках, їх холодової адаптації, наявності чи відсутності етапу центрифугування під час підготовки зразків до кріоконсервування.

Таким чином, мікроводорості мають важливе значення для біотехнології, харчової промисловості та збереження біорозмаїття й стабільності екосистем, а знання їх фізіологічних особливостей та підходів щодо ефективного кріоконсервування дозволяють розробляти ефективні методи довгострокового зберігання та підвищувати життєздатність деконсервованих культур.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Возовик КД, Шевченко НО. Вплив умов низькотемпературного зберігання на життєздатність мікроводорості *Chlorococum dissectum*. Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія «Біологія». 2022; 39: 12–9.
2. Золотарьова ОК, Михайленко НФ, Сиваш ОО, Шнюкова ЄІ. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. Київ: Альтерпрес; 2008. 234 с.
3. Мокросноп ВМ, Золотарьова ОК. Акумуляція  $\alpha$ -токоферолу в клітинах мікроводоростей. Мікробіологія і біотехнологія. 2021; 2 (52): 6–26.
4. Яремич АВ, Карамушка ВІ, Крамаренко АО. Дистанційний контроль вирощування мікроводоростей в умовах регулювання середовища культивування. Гідробіологічний журнал. 2021; 57 (1): 50–8.
5. Abate R, Oon YL, Oon YS, et al. Diverse interactions between bacteria and microalgae: A review for enhancing harmful algal bloom mitigation and biomass processing efficiency. *Heliyon* [Internet]. 2024 Sep 15 [cited 17.04.2025]; 10 (17): e36503. Available from: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(24\)12534-0](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(24)12534-0)
6. Abinandan S, Subashchandrabose SR, Pannerselvan L, et al. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus sp.* MAS1 and *Heterochlorella sp.* MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. *Bioresour Technol.* 2019; 278: 9–16.
7. Abinandan S, Subashchandrabose SR, Venkateswarlu K, et al. Acid-tolerant microalgae can withstand higher concentrations of invasive cadmium and produce sustainable biomass and biodiesel at pH 3.5. *Bioresour Technol.* 2019; 281: 469–73.
8. Arguelles EDLR, Martinez-Goss MR. Diversity of Philippine photosynthetic euglenophytes and their potential biotechnological uses: a review. *Int J Emerging Technol.* 2019; 10(4): 24–31.
9. Balasubramaniam V, Gunasegavan RD, Mustar S, et al. Isolation of industrial important bioactive compounds from

- microalgae. *Molecules* [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 18.04.2025]; 26(4): 943. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/943>
10. Bedard S, Roxborough E, O'Neill E, Mangal V. The biomolecules of *Euglena gracilis*: harnessing biology for natural solutions to future problems. *Protist* [Internet]. 2024 May 31 [cited 17.04.2025]; 175(4): 126044. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1434461024000361>
  11. Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes IDAA, et al. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina spp.*: Current status and future trends. *Food Chem Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 30 [cited 13.03.2025]; 5: 100134. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666566222000624>
  12. Bui TV, Ross IL, Jakob G, Hankamer B. Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. *PLoS One* [Internet]. 2013 Nov 11 [cited 12.03.2025]; 8(11): e78668. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0078668>
  13. Carvalho RH, Callegari MA, Dias CP, et al. *Euglena gracilis*  $\beta$ -glucans (1,3): enriching colostrum of sow for enhanced piglet immunity. *Animals* [Internet]. 2023 Nov 12 [cited 14.04.2025]; 13(22): 3490. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/22/3490>
  14. Chen Z, Dong Y, Duan S, et al. A chromosome-level genome assembly for the paramylon-producing microalga *Euglena gracilis*. *Sci Data* [Internet]. 2024 July 16 [cited 15.04.2025]; 11(1): 780. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41597-024-03404-y>
  15. Chernobai NA, Kadnikova NG, Vozovyyk KD, et al. Temperature-salt stress increases yield of valuable metabolites and shelf life of microalgae. *Biophys Bull.* 2022; 48: 7—17.
  16. Čížková M, Mezricky P, Mezricky D, et al. Bioaccumulation of rare earth elements from waste luminophores in the red algae, *Galdieria phlegrea*. *Waste Biomass Valor.* 2021; 12: 3137—46.
  17. Collins T, Margesin R. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(7): 2857—71.
  18. Corbett LL, Parker DL. Viability of lyophilized cyanobacteria (blue-green algae). *Appl Environ Microbiol.* 1976; 32(6): 777—80.
  19. Cvetkovska M. Algae use the underwater light spectrum to sense depth. *Nature.* 2025; 637(8046): 553—4.
  20. Dai JL, He YJ, Chen HH, Jiang JG. Dual roles of two malic enzymes in lipid biosynthesis and salt stress response in *Dunaliella salina*. *JAFC.* 2023; 71(45): 17067—79.
  21. Daily WA, McGuire JM. Preservation of some algal cultures by lyophilization. *Butl Univ Bot Stud.* 1954; 11(8/17): 139—43.
  22. Day JG, Brand JJ. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In: Andersen RA, editor. *Algal culturing techniques*. London: Elsevier Academic Press; 2005. p. 165—87.
  23. Day JG, Fleck RA. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae. *Microalgae Biotechnol.* 2015;1(1):1—11.
  24. Day JG, Watanabe MM, Turner MF. *Ex situ* conservation of protistan and cyanobacterial biodiversity: CCAP-NIES collaboration 1991–1997. *Phycol Res.* 1998; 46(s2): 77—83.
  25. Dubey S, Chen CW, Haldar D, Tambat VS, Kumar P, Tiwari A, Singhania RR, Dong CD, Patel AK. Advancement in algal bioremediation for organic, inorganic, and emerging pollutants. *Environ Pollut* [Internet]. 2023 Jan 15 [cited 08.03.2025]; 317: 120840. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749122020553>
  26. Ermilova E. Cold stress response: an overview in *Chlamydomonas*. *Front Plant Sci* [Internet] 2020 Sep 03 [cited 28.02.2025]; 11: 569437. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.569437/full>
  27. Fernandez-Valenzuela S, Chávez-Ruvalcaba F, Beltran-Rocha JC, et al. Isolation and culturing axenic microalgae: mini-review. *Open Microbiol J.* 2021; 15(1): 111—9.
  28. Foo SC, Mok CY, Ho SY, Khong NM. Microalgal culture preservation: Progress, trends and future developments. *Algal Res* [Internet]. 2023 Feb 23 [cited 25.02.2025]; 71(1): 103007. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926423000401>
  29. Foo SC, Lee ZS, Yap MKK, Tan JW. The antioxidant, wound healing properties and proteomic analysis of water extracts from the tropical cyanobacteria, *Nostoc NIES-2111\_MUM004*. *3Biotech* [Internet]. 2023 Feb 02 [cited 17.04.2025]; 13(2): 71. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-022-03448-0>
  30. Gan S, Liang S, Zou Q, Shang C. Optimization of carotenoid extraction of a halophilic microalgae. *PLoS One* [Internet]. 2022 Aug 2 [cited 15.04.2024]; 17(8): e0270650. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0270650>
  31. Garrido-Cardenas JA, Han X, Alonso DL, García-Maroto F. Evaluation and optimization of a methodology for the long-term cryogenic storage of *Tetrademus obliquus* at  $-80^{\circ}\text{C}$ . *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(5): 2381—90.
  32. Gharajeh HN, Valizadeh M, Dorani E, Hejazi MA. Biochemical profiling of three indigenous *Dunaliella* isolates with main focus on fatty acid composition towards potential biotechnological application. *Biotechnol Rep* [Internet]. 2020 June 2 [cited 11.03.2025]; 26: e00479. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20301235>

33. Hamlaoui S, Yéprémian C, Duval C, et al. The culture collection of cyanobacteria and microalgae at the French National Museum of Natural History: A century old but still alive and kicking! Including in memoriam: Professor Alain Couté. *Cryptogamie, Algologie*. 2022; 43: 41–83.
34. Henchion M, Hayes M, Mullen AM, et al. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods* [Internet]. 2017 July 20 [cited 13.03.2025]; 6: 53. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/6/7/53>
35. Hepburn C, Adlen E, Beddington J, et al. The technological and economic prospects for CO<sub>2</sub> utilization and removal. *Nature*. 2019; 575(7781): 87–97.
36. Holm-Hansen O. Viability of blue-green and green algae after freezing. *Physiol Plant*. 1963; 16(3): 530–40.
37. Hosseini A, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *J Appl Microbiol*. 2009; 107: 14–35.
38. Hosseinizand H, Sokhansanj S, Lim CJ. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Dry Technol*. 2017; 36(9): 1049–60.
39. Hyrslova I, Krausova G, Mrvikova I, et al. Functional properties of *Dunaliella salina* and its positive effect on probiotics. *Mar Drugs* [Internet]. 2022 Dec 15 [cited 09.03.2025]; 20: 781. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/20/12/781>
40. Jang HK, Kang JJ, Lee JH, et al. Comparison of annual biosynthetic calorie productions by phytoplankton in different southern Korean bays. *Frontiers in Marine Science* [Internet]. 2024 July 29 [cited 13.03.2025]; 11: 1367137. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/marine-science/articles/10.3389/fmars.2024.1367137/full>
41. Kihika JK, Wood SA, Rhodes L, et al. Cryoprotectant treatment tests on three morphologically diverse marine dinoflagellates and the cryopreservation of *Breviolum* sp. (Symbiodiniaceae). *Sci Rep* [Internet]. 2022 Jan 13 [cited 03.03.2025]; 12: 646. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-04227-2>
42. Kugler A, Kumari P, Kokabi K, et al. Resilience to freezing in the vegetative cells of the microalga *Lobosphaera incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J Phycol*. 2020; 56(2): 334–45.
43. Lam W, Lee TC, Tam NF, et al. Bacteria associated with *Karenia mikimotoi* in modulating its ichthyotoxicity. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2025 July 1 [cited 16.04.2025]; 216: 117939. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0025326X2500414X>
44. Leão PN, Martins TP, Abt K, et al. Incorporation and modification of fatty acids in cyanobacterial natural products biosynthesis. *Chem Comm*. 2023; 59(30): 4436–46.
45. Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol*. 2011; 162(3): 346–61.
46. Marx JG, Carpenter SD, Deming JW. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Can J Microbiol*. 2009; 55(1): 63–72.
47. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984; 247(3): 125–42.
48. Mock T. Algal model species for advancing biological sciences. *J Phycol*. 2023; 59(1): 1–3.
49. Morris GJ, Clarke A. The cryopreservation of *Chlorella*. 4. Accumulation of lipid as a protective factor. *Arch Microbiol*. 1978; 119(2): 153–6.
50. Morris GJ, McGrath JJ. Intracellular ice nucleation and gas bubble formation in *Spirogyra*. *Cryo Letters*. 1981; 2: 341–52.
51. Morris GJ. Cryopreservation of 250 strains of *Chlorococcales* by the method of two-step cooling. *Br Phycol J*. 1978; 13(1): 15–24.
52. Morris GJ. The cryopreservation of *Chlorella*. 2. Effect of growth temperature on freezing tolerance. *Arch Microbiol*. 1976; 107(3): 309–12.
53. Morschett H, Tenhaef N, Hemmerich J, et al. Robotic integration enables autonomous operation of laboratory scale stirred tank bioreactors with model-driven process analysis. *Biotechnol Bioeng*. [Internet]. 2021 Apr 19 [cited 16.04.2025]; 118(7): 275969. Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.27795>
54. Nagao M, Ozaki T, Fukuda H, et al. Alkane biosynthesis gene expression and its increased production in recombinant cyanobacteria. *FEBS Open Bio*. 2025; 15(6): 949–62.
55. Ortiz-Martínez VM, Andreo-Martínez P, García-Martínez N, et al. Approach to biodiesel production from microalgae under supercritical conditions by the PRISMA method. *Fuel Process Technol*. 2019; 191: 211–22.
56. Oslan SNH, Shoparwe NE, Yusoff AH, et al. A review on *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization of green and red stage culture conditions for the production of natural astaxanthin. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Feb 10 [cited 13.03.2025]; 11(2): 256. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/2/256>
57. Piasecki BP, Diller KR, Brand JJ. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: a cause of low viability at high cell density. *Cryobiology*. 2009; 58(1): 103–9.
58. Prieto A, Pedro Cañavate J, García-González M. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *J Biotechnol*. 2011; 151: 180–5.
59. Prieto-Guevara M, Alarcón-Furnieles J, Jiménez-Velásquez C, et al. Cryopreservation of the microalgae *Scenedesmus* sp. *Cells* [Internet]. 2023 Feb 09 [cited 11.03.2025]; 12: 562. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/4/562>

60. Puente-Sánchez F, Macías-Pérez LA, Campbell KL, et al. Bacterioplankton taxa compete for iron along the early spring-summer transition in the Arctic Ocean. *Ecol Evol* [Internet]. 2024 June 18 [cited 16.04.2025]; 14(6): e11546. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.11546>
61. Ramaraj S, Niran J. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int J Curr Sci*. 2013; 5: 67–73.
62. Raymond JA, Morgan-Kiss R, Stahl-Rommel S. Glycerol is an osmoprotectant in two Antarctic *Chlamydomonas* species from an ice-covered saline lake and is synthesized by an unusual bidomain enzyme. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020 Aug 20 [cited 13.02.2025]; 11: 1259. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.01259/full>
63. Remias D, Procházková L, Nedbalová L, et al. Novel insights in cryptic diversity of snow and glacier ice algae communities combining 18S rRNA gene and ITS2 amplicon sequencing. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2023 Dec 12 [cited 17.04.2025]; 99(12): 134. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article/99/12/fiad134/7330195>
64. Rojas-Villalta D, Rojas-Rodríguez D, Villanueva-Ilama M, et al. Exploring extremotolerant and extremophilic microalgae: new frontiers in sustainable biotechnological applications. *Biology* [Internet]. 2024 Sep 11 [cited 04.03.2025]; 13(9): 712. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/13/9/712>
65. Schulze PSC, Hulatt ChJ, Morales-Sánchez D, et al. Fatty acids and proteins from marine cold adapted microalgae for biotechnology. *Algal Res.* [Internet]. 2019 Sep 6 [cited 13.03.2025]; 42: 101604. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S22119264193012862>
66. Song H, He M, Wu C, et al. Global transcriptomic analysis of an Arctic *Chlorella*-Arc reveals its eurythermal adaptivity mechanisms. *Algal Res* [Internet]. 2020 Jan 21 [cited 13.03.2025]; 46: 101792. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926419309427>
67. Soru S, Malavasi V, Concas A, et al. A novel investigation of the growth and lipid production of the extremophile microalga *Coccomyxa melkonianii* SCCA 048 under the effect of different cultivation conditions: Experiments and modeling. *Chem Eng J* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 13.03.2025]; 377: 120589. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138589471832521X>
68. Stock W, Willems A, Mangelinckx S, et al. Selection constrains lottery assembly in the microbiomes of closely related diatom species. *ISME Commun* [Internet]. 2022 Feb 02 [cited 16.04.2025]; 2(1): 11. Available from: <https://academic.oup.com/ismecommun/article/2/1/11/7461074>
69. Taylor R, Fletcher RL. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies. *J Appl Phycol*. 1998; (10): 481–501.
70. Tzovenis I, Triantaphyllidis G, Naihong X, et al. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. *Aquaculture*. 2004; 230(1–4): 457–73.
71. Valledor L, Furuhashi T, Hanak AM, Weckwerth W. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Proteomics*. 2013; 12(8): 2032–47.
72. Verspreet J, Schoeters F, Bastiaens L. The impact of non-concentrated storage on the centrifugation yield of *Microchloropsis gaditana*: a pilot-scale study. *Life* [Internet]. 2024 Jan 17 [cited 07.05.2025]; 14(1): 131. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/14/1/131>
73. Zhang H, Yan Q, An Z, Wen Z. A revolving algae biofilm based photosynthetic microbial fuel cell for simultaneous energy recovery, pollutants removal, and algae production. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Oct 12 [cited 17.04.2025]; 13: 990807. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.990807/full>

Отримано 17.03.2025

Прийнято до друку 19.06.2025

N.A. Chernobai<sup>1,2\*</sup>, A.P. Gerilovych<sup>1,3</sup>, N.O. Shevchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> National Scientific Center "Hon. Prof. M.S. Bokarius Forensic Science Institute", Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup> Private Scientific Institution "One Health Scientific and Research Institute", Kharkiv, Ukraine

\* nadiiachernobai@gmail.com

#### BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROALGAE: STORAGE METHODS AND NON-CRYOGENIC FACTORS OF CRYOPRESERVATION EFFICIENCY

The review considers the prospects for the use and preservation techniques for microalgal collection samples. Microalgae have significant biotechnological potential in the food, pharmaceutical, environmental and energy sectors. The paper  
ISSN 2307-6143. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025. Т. 35, № 2

analyzes and summarizes current methods of maintaining microalgae cultures with a focus on their stability, preservation of biological properties, and long-term storage capabilities. The work includes a comparison of different approaches to microalgae preservation, including batch subcultivation, lyophilization, and cryopreservation. Particular attention is paid to cryopreservation as an effective method of long-term storage of genetically stable cultures, which minimizes the risk of losing valuable biotechnological characteristics. The influence of the stage of culture development, cell concentration in the suspension, cold adaptation, and centrifugation on the survival of microalgae after cryopreservation was determined. The results obtained are important for the development of biotechnological and environmental programs related to the use of microalgae.

**Key words:** microalgae, biotechnology, cryopreservation, lyophilization, cultivation, adaptation.