

Некоторые особенности замораживания галофильных микроводорослей на примере *Dunaliella salina* Teod.

Н.А. Чернобай, Н.Г. Кадникова

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Some Features of Freezing of Halophilic Microalgae

by Example of *Dunaliella salina* Teod.

N.A. Chernobai, N.G. Kadnikova

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

Одноклеточная зеленая водоросль *Dunaliella salina* Teod. обитает во всех соленоводных экосистемах разных климатических поясов, поэтому устойчивость к абиотическим стрессам делает эту микроводоросль уникальным модельным экстремофилом для изучения влияния факторов, возникающих на всех этапах криоконсервирования. Мало изучены и процессы кристаллизации при замораживании сложных термодинамических систем, к которым относятся многокомпонентные солевые среды роста галофильных микроорганизмов.

Цель работы – исследование толерантности клеток *D. salina* Teod., предварительно адаптированных к разным концентрациям NaCl (1,5; 3; 4М), к медленному замораживанию; анализ термограмм охлаждения этих суспензий для разработки научно-обоснованного подхода к криоконсервированию галофильных микроводорослей.

Изучение полученных с помощью классического температурного анализа термограмм процесса охлаждения со скоростью 1 град/мин сложных солевых сред и клеточных суспензий микроводоросли в диапазоне температур от 15 до -70°C позволило оценить степень переохлаждения и установить температуры начала кристаллизации. Интересно, что во всех образцах охлаждение вплоть до $-30...-35^{\circ}\text{C}$ не влияло на жизнеспособность клеток *D. salina* Teod. по сравнению с нативной культурой, хотя на термограммах в диапазоне от $-26,5$ до -32°C отмечено появление новых температурных перепадов, вероятно эвтектических зон.

При дальнейшем снижении температуры до -40°C отмечалась корреляция сохранности клеток и солености среды: сохранность тем выше, чем выше исходная соленость. Наиболее «драматические» события наблюдались в среде с содержанием 1,5М NaCl – после размораживания образцов микроскопически установлены необратимые структурные повреждения плазмалеммы и хлоропластов 50–69% клеток. Рекультивирование замороженных до -40°C и отогретых образцов также выявило эту зависимость.

Сохранение жизнеспособности клеток *D. salina* Teod. в температурном диапазоне от $-26,5$ до -40°C , вероятно, связано с тем, что с повышением концентрации NaCl в среде увеличивается количество внутриклеточных липидов, что снижает температуру внутриклеточной кристаллизации.

Таким образом, при криоконсервировании для наименьшей потери жизнеспособности микроводорослей *D. salina* Teod., как и для других галофильных микроорганизмов, целесообразно использовать культуры клеток, предварительно адаптированные к повышенным концентрациям солей.

Unicellular green algae *Dunaliella salina* Teod. lives in all salt water ecosystems of different climatic zones, therefore the resistance to abiotic stresses makes this microalgae an unique model extremophile for studying the influence of factors arising at all the stages of cryopreservation. The processes of crystallization during freezing of complex thermodynamic systems, which include multicomponent salt growth media of halophilic microorganisms, have been poorly studied as well.

The aim of this work was to study the tolerance of *D. salina* Teod. cells, preliminary adapted to different concentrations of NaCl (1.5; 3; 4M) to slow freezing and analysis of cooling thermograms of these suspensions in order to develop a scientifically based approach to the halophilic microalgae cryopreservation.

The analysis of thermograms of cooling process obtained at a rate of 1 deg/min of complex salt media and cell suspensions of microalgae within the temperature range from 15 to -70°C made it possible to estimate the degree of supercooling and establish the temperatures of crystallization onset. In all the samples, the cooling down to $-30...-35^{\circ}\text{C}$ had no effect on the *D. salina* Teod. cell viability in comparison with the native culture, although on the thermograms within the range from -26.5 to -32°C we noted the appearance of new temperature differences, probably in eutectic zones.

With a further temperature decrease down to -40°C , there was a correlation between the cell survival and medium salinity, *i. e.* the higher was initial salinity, the higher was preservation rate. The most dramatic events were observed in the medium with 1.5M NaCl content, *i. e.* after sample thawing the irreversible structural damages of the plasma membrane and chloroplasts of 50–69% of culture cells were established. Recultivation of frozen down to -40°C and heated samples also revealed this dependence.

The preservation of viability within the temperature range from -26.5 to -40°C is probably related to the fact that with an increase of NaCl concentration in the medium, the number of intracellular lipids increases too, that reduces the temperature of intracellular crystallization.

Thus, for the *D. salina* Teod. microalgae, as well as for other halophilic microorganisms, in order to minimize a loss of cell viability during cryopreservation, it is expedient to use the cell cultures, preliminary adapted to increased salt concentrations.

