

УДК 547.42.577.121:582.232

К.Д. Возовик\*, Н.А. Чернобай, Н.Г. Каднікова, Н.О. Шевченко

## Вплив криозахисних розчинів на метаболічну активність культури клітин *Chlorococcum dissectum* та *Dunaliella salina*

UDC 547.42.577.121:582.232

K.D. Vozovyk\*, N.A. Chernobai, N.G. Kadnikova, N.O. Shevchenko

### Effect of Cryoprotective Solutions on Metabolic Activity of *Chlorococcum Dissectum* and *Dunaliella Salina* Cell Cultures

**Реферат:** Розробка протоколів криоконсервування мікроводоростей *Chlorococcum dissectum* Korshikov та *Dunaliella salina* Teodoresco потребує підбору ефективних криопротекторів та їхніх концентрацій. Одним з етапів вибору оптимальних концентрацій криопротекторів є визначення ступеня токсичності для клітин на етапі еквілібрації. У роботі використовували розчини диметилсульфоксиду, етиленгліколю, етилового спирту, гліцерину (5–30%), модифікованого PVS1 та PVS2 (50 і 75%). Вплив криозахисних сполук визначали за тестом відновлення резазурину. Найменший пошкоджувальний вплив на клітини *Ch. dissectum* чинив 10%-й розчин гліцерину. Обробка зразків розчинами етанолу і диметилсульфоксиду зменшувала метаболічну активність на 31–33%, етиленгліколю — на 50%. Інкубація у 75%-му модифікованому PVS1 та 50 і 75%-х розчинах PVS2 знижувала метаболічну активність більш ніж удвічі порівняно з контролем. Найбільш токсичним криопротектором для культури *D. salina* виявився етиловий спирт. Експозиція клітин у розчинах диметилсульфоксиду, етиленгліколю та гліцерину зменшувала метаболічну активність на 25%. Інкубація клітин *D. salina* у PVS не впливала на досліджуваний показник.

**Ключові слова:** криоконсервування, мікроводорості, криозахисні розчини, токсичність, метаболічна активність.

**Abstract:** Development of protocols for cryopreservation of microalgae *Chlorococcum dissectum* Korshikov and *Dunaliella salina* Teodoresco requires selection of effective cryoprotectants and their concentrations. One of the stages of choosing the optimal concentrations of cryoprotectants is determining the degree of toxicity for cells at the equilibration stage. Solutions of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, ethanol, glycerol (5–30%) and modified PVS1 and PVS2 (50 and 75%) were used in the research. The effect of cryoprotective compounds was determined by the resazurin reduction test. The least damaging effect on the *Ch. dissectum* cells was made by a 10% solution of glycerol. Treatment of the samples with ethanol and dimethyl sulfoxide solutions reduced metabolic activity by 31–33%, the ethylene glycol ones did by 50%. Incubation in 75% modified PVS1, 50 and 75% PVS2 solutions reduced the metabolic activity by more than half compared to the control. Ethanol was the most toxic cryoprotectant for *D. salina* cells. Exposure of cells to the solutions of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol reduced metabolic activity by 25%. Incubation of *D. salina* cells in PVS did not affect the studied index.

**Key words:** cryopreservation, microalgae, cryoprotective solutions, toxicity, metabolic activity.

Мікроводорості об'єднують численну групу переважно морських або прісноводних еукаріотичних мікроорганізмів із різноманітною будовою. Зазвичай вони присутні у великій кількості в екосистемах і є ефективним біоіндикатором навколишнього середовища (наприклад, зміни клімату та евтрофікації). Здатність до синтезу органічних речовин з неорганічних, багатий біохімічний склад, висока швидкість відновлення та лабільність обмінних процесів у клітинах є підґрунтям для комерційного застосування з метою отримання добрив та кормів, використання у харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловості [3, 6, 8, 12], очищення стічних вод та вироблення біопалива [1, 7]. Головна перевага промислового використання водоростей — це

Microalgae are the large group of mainly marine or freshwater eukaryotic microorganisms with various structures. Usually, they are present in large quantities in ecosystems, being an effective environmental bioindicator (for example, climate change and eutrophication). The ability to synthesize organic substances from inorganic, rich biochemical composition, high rate of restoration and lability of metabolic processes in cells is the basis for commercial use in order to obtain fertilizers and feed, usage in food, pharmaceutical and cosmetic industries [3, 6, 8, 12], sewage treatment and biofuel production [1, 7]. The main advantage of industrial use of algae is a reduction in the load on natural ecosystems, most of which are currently largely exhausted.

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: k.vozovyk@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: k.vozovyk@gmail.com

Надійшла 22.10.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

Received 22, October, 2022

Accepted 27, February, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023  
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

зменшення навантаження на природні екосистеми, більшість з яких на даний час значною мірою виснажені.

У зв'язку з перспективністю використання мікроводоростей у якості природних продуцентів біологічно важливих сполук наразі постає потреба в розробленні ефективних способів зберігання найбільш важливих таксонів. Основною метою будь-якої стратегії збереження біооб'єктів є гарантія того, що культури будуть репрезентативними для інтактного ізоляту, не матимуть морфологічних, функціональних та генетичних змін [10].

Історично колекційні зразки мікроводоростей підтримувалися за допомогою звичайних серійних субкультур. Більшість дослідників використовують даний спосіб у тому випадку, коли задіяна відносно невелика кількість об'єктів. Незважаючи на зручність такого підходу, він не може забезпечити мікробіологічну «чистоту» та повну гарантію генетичної чи функціональної стабільності, тобто виконати основні умови розвитку біотехнологічного сектора.

Існує невелика доказова база стосовно фенотипової та функціональної стабільності мікроводоростей протягом десятиліть, однак вона не властива більшості перспективних таксонів, безперервне культивування яких призводить до морфогенетичних змін та втрати здатності до продукування комерційно важливих метаболітів [7, 10].

Кріоконсервування як спосіб зберігання життєздатних клітин, тканин та організмів за наднизьких температур (зазвичай при температурі рідкого азоту ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) чи в його парах ( $-156^{\circ}\text{C}$ )) є оптимальним для довготривалого збереження життєздатності, генетичної та функціональної стабільності клітин мікроводоростей [10, 11, 13].

Процедура кріоконсервування включає різні підготовчі етапи: холодове загартування, культивування на відповідних поживних середовищах, додавання кріозахисних сполук, охолодження, зберігання та відновлення росту клітин. Слід зазначити, що на кожному з етапів може відбуватися травмування клітин [10, 11].

Мета роботи — визначення пошкоджувальної дії різних концентрацій перспективних кріозахисних розчинів на клітини мікроводоростей *Chlorococcum dissectum* Korshikov та *Dunaliella salina* Teodoresco для розроблення ефективного протоколу їх кріоконсервування.

### Матеріали та методи

Культури мікроводоростей *Ch. dissectum* та *D. salina* були отримані з колекції кафедри бота-

Due to the possibility of using microalgae as natural manufacturers of biologically important compounds, it is necessary to develop effective ways to store the most important taxa. The main goal of any strategy for preserving the bio-objects is to guarantee that cultures will be representative for intact isolates, will not have morphological, functional and genetic changes [10].

Historically, the collection samples of microalgae are maintained using conventional serial subcultures. Most researchers use this method when a relatively small number of objects is involved. Despite the convenience of this approach, it cannot ensure microbiological 'purity' and a complete guarantee of genetic or functional stability, which is necessary to meet the basic conditions for the development of the biotechnological sector.

There is a small evidence for the phenotypic and functional stability of microalgae for decades, but it is not common for most promising taxa, continuous cultivation of which leads to morphogenetic changes and loss of ability to produce commercially important metabolites [7, 10].

Cryopreservation as a way of storage of viable cells, tissues and organisms at low temperatures (usually at liquid nitrogen temperature ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) or in vapors ( $-156^{\circ}\text{C}$ )) is optimal for long-term preservation of viability, genetic and functional stability [10, 11, 13].

The cryopreservation procedure includes various preparatory stages: cold hardening, cultivation in the relevant cultivation media, adding cryoprotective compounds, cooling, storage and restoration of cell growth. It should be noted that at each of the stages there may be injury to cells [10, 11].

The aim of this study was to determine the damaging effect of different concentrations of promising cryoprotective solutions on the cells of the *Chlorococcum dissectum* Korshikov and *Dunaliella salina* Teodoresco for the development of effective protocol of their cryopreservation.

### Materials and methods

Cultures of microalgae *Ch. dissectum* and *D. salina* were obtained from the collection of the Department of Botany of V.N. Karazin Kharkiv National University.

*Cultivation of cell suspensions.* Cell suspension with a volume of 15 ml was cultured before the start of the stationary growth phase in 250 ml Erlenmeyer glass flasks (StarLab, Kyiv) (*Ch. dissectum*) and 50 ml cultural bottles with a ventilation cap (TPP, Switzerland) (*D. salina*) at temperatures ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and round-the-clock light with white fluorescent light  $52.84 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  without aeration [14].

ніки Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

*Культивування клітинних суспензій.* Культивування суспензійних культур об'ємом 15 мл здійснювали до початку стаціонарної фази росту в 250 мл скляних колбах Ерленмейера (Starlab, Київ) (*Ch. dissectum*) та 50 мл культуральних флаконах з вентиляцією (TPP, Швейцарія) (*D. salina*) за температури  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$  і при цілодобовому освітленні білим флуоресцентним світлом 52,84 мкмоль фотонів  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  без аерації [14].

Клітини *Ch. dissectum* культивували на рідкому поживному середовищі БЖ-11 [3], *D. salina* — на середовищі Рамарай [16]. Накопичення біомаси визначали шляхом підрахунку кількості клітин у камері Горяєва.

*Визначення токсичності криозахисних розчинів.* У роботі досліджували вплив криозахисних середовищ двох груп. До першої групи увійшли розчини проникних криопротекторів [5], які зазвичай використовують для повільного охолодження: диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ), етиловий спирт (ЕтОН) у кінцевих концентраціях 5, 10, 15%, гліцерин (ГЛ) у кінцевій концентрації 10, 15, 20 та 30%. Другу групу склали здатні до склування розчини, які використовуються для криоконсервування рослинних об'єктів методом вітрифікації (PVS): модифікований PVS1 (22% ГЛ + 13% 1,2-пропіленгліколю + 13% ЕГ + 6% ДМСО + 0,4 М сахарози) та PVS2 (30% ГЛ + 15% ЕГ + 15% ДМСО + 0,4 М сахарози) у кінцевих концентраціях 50 та 75% [17, 20]. Розчини криопротекторів готували на відповідних поживних середовищах.

Зважаючи на те, що сучасні методи низькотемпературного зберігання клітин мікроводоростей часто потребують тривалого контакту з криопротекторними сумішами [17, 18], особливо під час повільного охолодження зі швидкістю 1 град/хв, термін інкубації з дослідженими розчинами складав 60 хв.

Після інкубації клітини відмивали від криопротектора у відповідному середовищі культивування (БЖ-11 для *Ch. dissectum*, Рамарай для *D. salina*) шляхом двократного 3-хвилинного центрифугування при 3000 г.

*Визначення метаболічної активності клітин.* Пошкоджувальну дію криозахисних сполук на клітини мікроводоростей оцінювали за метаболічною активністю (Alamar Blue-тест (АВ-тест)) [9]. Культуру клітин об'ємом 200 мкл поміщали у 96-лункові планшети (Starlab, Україна). До кожної проби додавали 20 мкл барвника Alamar Blue (Serotec Ltd, США). Зразки інкубували 20 годин

*Ch. dissectum* was cultivated on BG-11 liquid medium [3], *D. salina* was cultivated on Ramaraj medium [16]. Biomass accumulation was determined by counting the number of cells in a Goryaev chamber.

*Determination of the toxicity of cryoprotective solutions.* The effect of cryoprotective media of two groups was studied in this work. The first group included the solutions of permeable cryoprotectants [5], commonly used for slow cooling: dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), ethanol (EtOH) in final concentrations of 5, 10, 15%, glycerol (GL) in final concentrations of 10, 15, 20 and 30%. The second group consisted of the solutions capable of vitrification, which are used for cryopreservation of plant objects by the vitrification method (plant vitrification solutions (PVS)): modified PVS1 (22% GL + 13% 1,2-propylene glycol + 13% EG + 6% DMSO + 0.4 M sucrose) and PVS2 (30% GL + 15% EG + 15% DMSO + 0.4 M sucrose) at final concentrations of 50 and 75% [17, 20]. Solutions of cryoprotectants were prepared with appropriate culture media.

Considering that current methods of low-temperature storage of microalgae cells often require prolonged contact with cryoprotective mixtures [17, 18], especially during slow cooling at a rate of 1 deg/min, the incubation period with the studied solutions was 60 min.

After incubation, the cells were washed from the cryoprotectant in the appropriate culture medium (BG-11 for *Ch. dissectum*, Ramaraj for *D. salina*) by two-fold 3-min centrifugation at 3000 g.

*Determination of metabolic activity of cells.* The damaging effect of cryoprotective compounds on microalgae cells was assessed by metabolic activity (Alamar Blue test (AB test)) [9]. Cell culture with a volume of 200  $\mu\text{l}$  was placed in 96-well plates (Starlab, Ukraine). Each sample was supplemented with 20  $\mu\text{l}$  of Alamar Blue dye (Serotec Ltd, USA). The samples were incubated for 20 hrs in a thermostat without access to light at  $28^\circ\text{C}$ .

The amount of reduced dye was determined by the fluorescence intensity of reduced resazurin using a Tecan GENios plate spectrophotometer (Tecan Inc, Austria) at a wavelength of 550 nm. The obtained data were processed using the XFLUOR4 v.4.50 software.

The concentration of cells in samples of the corresponding culture was the same and amounted to  $1.61 \times 10^8$  cells/ml for *D. salina* and  $1.20 \times 10^8$  cells/ml for *Ch. dissectum*. An intact culture was used as a control.

The results were statistically processed using the Past V.3.15 software (University of Oslo, Norway).



у термостаті без доступу світла за температури 28°C.

Кількість відновленого барвника визначали за інтенсивністю флуоресценції відновленого резаурину на планшетному спектрофотометрі «Tescan GENios» (Tescan Inc, Австрія) при довжині хвилі 550 нм. Отримані дані обробляли за допомогою програми «XFLUOR4 v.4.50».

Концентрація клітин у зразках відповідної культури була однаковою і становила:  $1,61 \times 10^8$  кл/мл для *D. salina* та  $1,20 \times 10^8$  кл/мл для *Ch. dissectum*. У якості контролю використовували інтактну культуру.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми «Past V.3.15» (Університет м. Осло, Норвегія). Визначали середнє значення та стандартне відхилення ( $M \pm \sigma$ ). Значущість різниці між показниками оцінювали за критерієм Тьюкі. Різницю між вибірками вважали значущою при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Основна мета додавання кріопротекторів до біологічних об'єктів — запобігання пошкодженню клітин під час зниження температури нижче точки кристалізації води, при цьому використання кріозахисних речовин обмежується їхньою токсичністю

Кріопротектори вважаються токсичними, якщо вони пошкоджують клітинні мембрани, ДНК, білок або інші макромолекули, впливають на функцію ферментів, мітохондрій. Ефекти, які вважаються результатом токсичності, насправді є виявленням осмотичного шоку, окиснювального стресу або іншими ще нез'ясованими причинами. Токсичність може бути специфічною для конкретної кріозахисної сполуки або наслідком їхньої дії (неспецифічна токсичність) [4].

Під час аналізу результатів дослідження необхідно враховувати експериментальні умови (температура, концентрація, тривалість впливу на біологічні об'єкти), вид розчинника та метод визначення життєздатності клітин [4].

У роботі використовували кріопротектори, які проникають через клітинні мембрани, входять до складу різних PVS. Дані речовини успішно застосовуються для кріоконсервування різних рослинних об'єктів та мікроводоростей [5, 15, 19].

На рис. 1 представлено вплив різних концентрацій кріопротекторів на відновлення резаурину клітинами *Ch. dissectum*. Показано, що усі досліджені сполуки в концентраціях, які використовували в експерименті, значуще знижували інтенсивність флуоресценції відновленого резаурину.

The average value and standard deviation ( $M \pm \sigma$ ) were determined. The significant difference between the indices was assessed by Tukey's test. The difference between samples was considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### Results and discussion

The main purpose of adding the cryoprotectants to biological objects is to prevent cell injury when the temperature drops below the crystallization point of water, herewith the use of cryoprotectants is limited by their toxicity.

Cryoprotectants are considered toxic if they damage cell membranes, DNA, protein or other macromolecules, affect the function of enzymes, mitochondria. Effects thought to be the result of toxicity are actually manifestation of osmotic shock, oxidative stress, or other reasons not yet clarified. Toxicity may be specific to a particular cryoprotective compound or a consequence of their impact (non-specific toxicity) [4].

When analyzing the results of the study, it is necessary to consider the experimental conditions (temperature, concentration, time of exposure to biological objects), the type of solvent, and the method for determining cell viability [4].

We used cryoprotectants penetrating through cell membranes that are part of various PVS. These substances are successfully used for cryopreservation of various plant objects and microalgae [5, 15, 19].

Fig. 1 displays the effect of different concentrations of cryoprotectants on resazurin reduction by *Ch. dissectum* cells. It was shown that all investigated compounds in the concentrations used in the experiment significantly decreased the fluorescence intensity of reduced resazurin.

It was revealed that the exposure of the cell suspension of *Ch. dissectum* at the studied concentrations of EtOH significantly reduced the metabolic activity according to the AB test relative to the control (by 30–40%). No significant difference between the effect of 5% and 10% EtOH solutions was found. The decrease in this index in a 15% EtOH solution was significant compared to a 5% one and did not differ at the level of error compared to 10% solution (Fig. 1, Table 1).

The addition of EG at the studied concentrations to microalgae cells halved the fluorescence of reduced resazurin. There was no significant difference in metabolic activity after using EG solutions of 5, 10, and 15%; it decreased to 47–54% (Fig. 1, Table 1).

Exposure of the cell suspension to the indicated solutions of DMSO led to a decrease in their meta-

Встановлено, що експозиція суспензії клітин *Ch. dissectum* у досліджуваних концентраціях ЕтОН значуще зменшувала метаболічну активність за АВ-тестом по відношенню до контролю (на 30–40%). Значущої різниці між дією 5 та 10%-х розчинів ЕтОН не виявлено. Зменшення вказаного показника у 15%-му розчині ЕтОН було значущим порівняно з 5%-м та не відрізнялося на рівні похибки від 10%-го розчину (рис. 1, табл. 1).

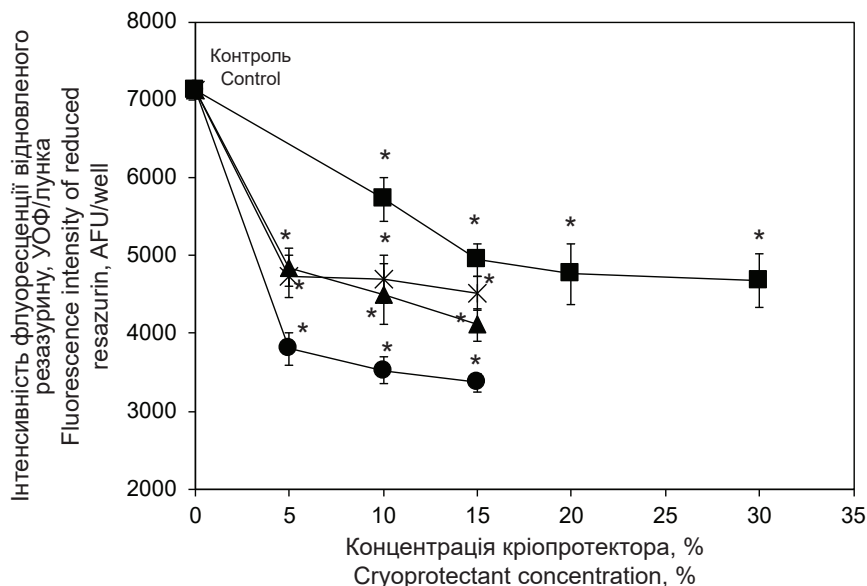
Додавання ЕГ у досліджуваних концентраціях до клітин мікроводоростей вдвічі зменшувало флуоресценцію відновленого резазурину. Значущої різниці у показниках метаболічної активності після використання розчинів ЕГ 5, 10 та 15% не спостерігалось, вона зменшувалася до 47–54% (рис. 1, табл. 1).

Експозиція суспензії клітин у вказаних розчинах ДМСО призводила до зниження їхньої метаболічної активності на 32–36% відносно контролю (табл. 1), збільшення концентрації з 5 до 15% значуще не змінювало інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину (рис. 1).

Найбільший показник інтенсивності флуоресценції було отримано для 10%-го розчину гліцерину (рис. 1). Підвищення концентрації цього криопротектора до 15, 20 та 30% зменшувало метаболічну активність на 30–35% відносно контролю (табл. 1).

На рис. 2 наведено результати визначення впливу різних розчинів криопротекторів на інтенсивність флуоресценції резазурину, відновленого клітинами *D. salina*. Показано, що культура цієї мікроводорості виявилась більш стійкою до дії усіх досліджуваних криозахисних речовин порівняно з культурою *Ch. dissectum*.

Так, додавання до культури *D. salina* ЕГ та ДМСО у концентрації 5 та 10% не впливало на інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину порівняно з контролем, тоді як експозиція клітин у розчинах цих криопротекторів 15% значуще зменшувала даний показник (рис. 2), спостерігали пригнічення метаболічної активності порівняно з контролем до 87 та 82% відповідно (табл. 1).



**Рис. 1.** Інтенсивність флуоресценції резазурину, відновленого клітинами *Ch. dissectum*, за дії різних концентрацій: ▲ — етилового спирту, ● — етиленгліколю, × — диметилсульфоксиду, ■ — гліцерину; \* — різниця значуща відносно контролю,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Fluorescence intensity of resazurin reduced by *Ch. dissectum* cells, under the influence of various concentrations: ▲ – ethanol, ● – ethylene glycol, × – dimethyl sulfoxide, ■ – glycerol; \* – significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ .

bolistic activity by 32–36% relative to the control (Table 1); an increase in the concentration from 5 up to 15% did not significantly change the fluorescence intensity of reduced resazurin (Fig. 1).

The highest fluorescence intensity was obtained for 10% glycerol solution (Fig. 1). An increase in the concentration of this cryoprotectant to 15, 20 and 30% reduced the metabolic activity by 30–35% relative to the control (Table 1).

Fig. 2 shows the results of determining the effect of different solutions of cryoprotectants on the fluorescence intensity of resazurin reduced by *D. salina* cells. It was shown that the culture of this microalga was more resistant to the influence of all studied cryoprotectants compared to the *Ch. dissectum* culture.

Thus, the addition of EG and DMSO at concentrations of 5 and 10% to the *D. salina* culture did not affect the fluorescence intensity of reduced resazurin compared to the control, while the exposure of cells to 15% solutions of these cryoprotectants significantly reduced this index (Fig. 2), there was the inhibition of metabolic activity to 87 and 82%, respectively, vs. the control (Table 1).

The metabolic activity of *D. salina* cells significantly decreased after the addition of 15–30% GL solutions, and an increase in the cryoprotectant concentration within the indicated range did not

**Таблиця 1.** Метаболічна активність *Ch. dissectum* та *D. salina* за дії різних розчинів криопротекторів  
**Table 1.** Metabolic activity of *Ch. dissectum* and *D. salina* under the influence of various solutions of cryoprotectants

Кріопротектор Cryoprotectant	Концентрація кріопротектора, % Cryoprotectant concentration, %	Метаболічна активність клітин за дії кріопротекторів, % відносно контролю Metabolic activity of cells under the influence of cryoprotectants, % relative to the control	
		<i>Ch. dissectum</i>	<i>D. salina</i>
Контроль Control	–	100 ± 1,39	100 ± 7,34
Гліцерин Glycerol	10	81 ± 4,02*	91 ± 13,6
	15	71 ± 2,99*#	79 ± 3,49*
	20	67 ± 5,5*	76 ± 1,08*
	30	66 ± 4,87*	75 ± 1,17**
Етиловий спирт Ethanol	5	69 ± 3,46*	81 ± 1,39*
	10	64 ± 5,55*	69 ± 1,23**
	15	58 ± 3,18*#	64 ± 1,13**
Диметилсульфоксид Dimethylsulfoxide	5	67 ± 3,97*	97 ± 4,0
	10	68 ± 4,43*	89 ± 5,73
	15	64 ± 3,11*	82 ± 3,22**
Етиленгліколь Ethylene glycol	5	54 ± 2,89*	93 ± 11,29
	10	49 ± 2,38*	91 ± 5,66
	15	47 ± 1,66*	87 ± 4,58*

**Примітки:** \* — різниця значуща відносно контролю, # — різниця значуща порівняно з мінімальною концентрацією кріопротектора,  $p < 0,05$ .

**Notes:** \* – significant difference compared to the control, # – significant difference compared to the minimum concentration of cryoprotectant,  $p < 0.05$ .

Метаболічна активність клітин *D. salina* значуще знижувалася після додавання 15–30%-го розчину ГЛ, при чому підвищення концентрації кріопротектора у зазначеному діапазоні додатково не змінювало інтенсивність флуоресценції. Додавання ГЛ у концентрації 10% не виявляло пошкоджувальної дії на клітини (рис. 2, табл. 1).

Найбільш токсичним кріопротектором для клітин *D. salina* виявився EtOH, який у досліджуваних концентраціях значуще знижував інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину, при чому підвищення його вмісту у розчині призводило до більшої вираженої дії (рис. 2, табл. 1).

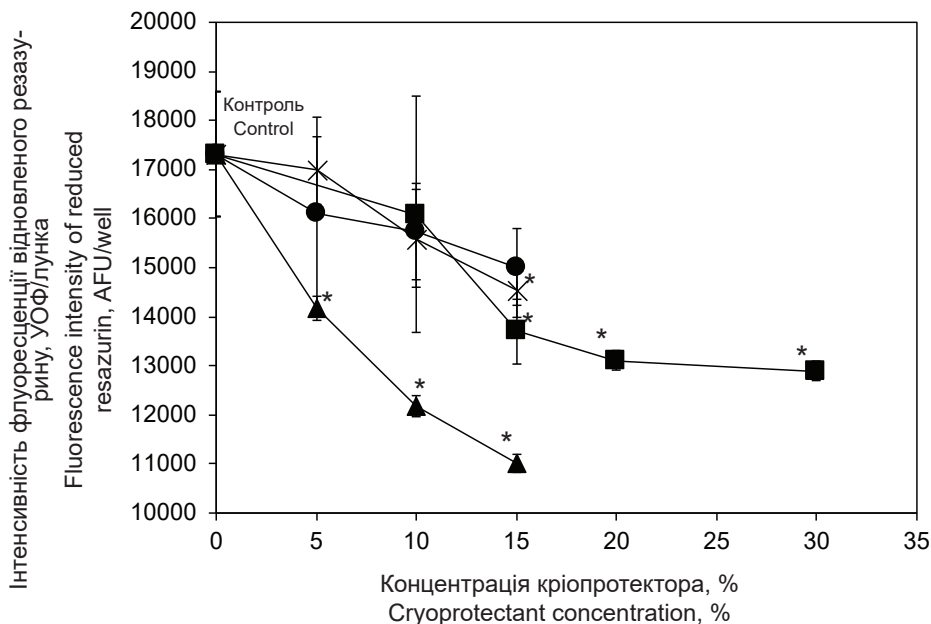
На рис. 3 показано вплив різних концентрацій модифікованого PVS1 та PVS2 на інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину в клітинах *Ch. dissectum*. Виявлено, що додавання модифікованого PVS1 та PVS2 у концентраціях 50% значуще знижувало інтенсивність флуоресценції, збільшення концентрації кріопротекторів до 75% додатково зменшувало даний показник.

further change the fluorescence intensity. The addition of GL at a concentration of 10% had no damaging effect on the cells (Fig. 2, Table 1).

The most toxic cryoprotectant for *D. salina* cells was EtOH, which at the studied concentrations significantly reduced the fluorescence intensity of lowered resazurin, while an increase in its concentration led to a more noticeable effect (Fig. 2, Table 1).

Fig. 3 shows the effect of different concentrations of modified PVS1 and PVS2 on the fluorescence intensity of reduced resazurin in *Ch. dissectum*. It was found that the addition of modified PVS1 and PVS2 at concentrations of 50% significantly reduced the fluorescence intensity, and an increase in cryoprotectant concentration up to 75% further diminished this index.

A decrease in metabolic activity of *Ch. dissectum* after exposure in solutions of 50 and 75% modified PVS1 compared to the control was 33 and 61%, respectively. A more than two-fold reduc-



**Рис. 2.** Інтенсивність флуоресценції резазурину, відновленого клітинами *D. salina*, за дії різних концентрацій: ▲ — етилового спирту, ● — етиленгліколю, × — диметилсульфоксиду, ■ — гліцерину; \* — різниця значуща відносно контролю,  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Fluorescence intensity of resazurin reduced by *D. salina* cells, under the influence of various concentrations: ▲ — ethanol, ● — ethylene glycol, × — dimethyl sulfoxide, ■ — glycerol; \* — significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ .

Зменшення метаболічної активності *Ch. dissectum* після експозиції у розчинах модифікованого PVS1 50 та 75% порівняно з контролем складало 33 та 61% відповідно. Зниження досліджуваного показника більш ніж удвічі показано після інкубації клітин у PVS2 50 та 75% (табл. 2).

Дослідження флуоресценції відновленого резазурину після експозиції *D. salina* у 50%-му модифікованому PVS1 показало відсутність значущої різниці порівняно з контролем. Підвищення концентрації PVS1 до 75% викликало зниження даного показника. Додавання PVS2 у концентраціях 50 та 75% до суспензії клітин значуще зменшувало інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину (рис. 4).

Метаболічна активність *D. salina* після експозиції у 50%-му модифікованому PVS1 значуще не відрізнялася від контрольних значень. Збільшення концентрації PVS1 до 75%-в та інкубація клітин у 50 та 75%-х розчинах PVS2 знижували досліджуваний показник на 5% (табл. 2).

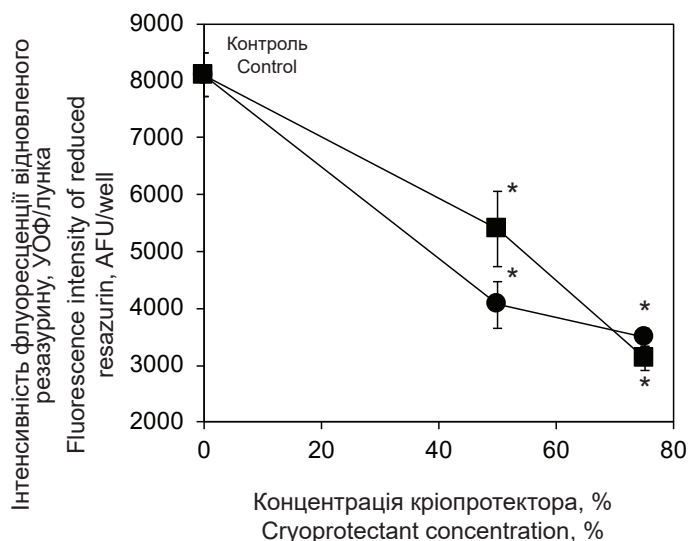
Дослідження впливу криопротекторів різних класів хімічних сполук на життєдатність мікроводоростей *Ch. dissectum* та *D. salina*, визначену за АВ-тестом показало наступне. Найбільш стійкою до

tion of the studied index was shown after incubation of cells in 50 and 75% PVS2 (Table 2).

A study of the fluorescence of reduced resazurin after exposure to *D. salina* in 50% modified PVS1 showed no significant difference compared to the control. An increase in PVS1 concentration to 75% caused a decrease in this index. The addition of PVS2 at concentrations of 50 and 75% to the cell suspension significantly diminished the fluorescence intensity of reduced resazurin (Fig. 4).

The metabolic activity of *D. salina* after exposure to 50% modified PVS1 did not differ significantly from the control values. Increasing the PVS1 con-

centration to 75% and cell incubation in 50 and 75% PVS2 solutions reduced the studied parameter by 5% (Table 2).



**Рис. 3.** Інтенсивність флуоресценції резазурину, відновленого клітинами *Ch. dissectum* за дії різних концентрацій PVS: ■ — модифікований PVS1, ● — PVS2; \* — різниця значуща відносно контролю,  $p < 0,05$ .

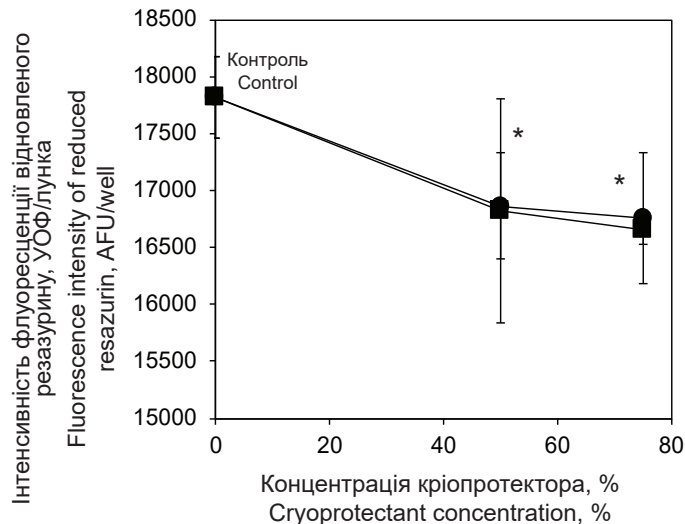
**Fig. 3.** Fluorescence intensity of resazurin reduced by *Ch. dissectum* cells, under the influence of various concentrations of PVS: ■ — modified PVS1, ● — PVS2; \* — significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ .

дії усіх моно- та багатокомпонентних кріопротекторів у досліджуваних концентраціях виявилась мікроводорість *D. salina*. За показниками інтенсивності флуоресценції в культурі клітин метаболічна активність була не нижче 64% від контрольних значень.

Результати вивчення впливу низькомолекулярних кріопротекторів на клітини мікроводорості *Ch. dissectum* показали, що найменшу пошкоджувальну дію на їхню метаболічну активність чинив розчин ГЛ. Після обробки зразків розчинами ЕтОН і ДМСО встановлено зниження метаболічної активності за показниками інтенсивності флуоресценції відновленого резазурину на рівні 67–69% від значень контролю. Найбільш токсичним виявився ЕГ, який майже вдвічі знижував досліджуваний показник.

Реакція мікроводорості *Ch. dissectum* на окремі низькомолекулярні кріопротектори може пояснити вплив багатокомпонентних кріозахисних розчинів на метаболічну активність. Так, якщо ГЛ і ДМСО були малотоксичні по відношенню до клітин *Ch. dissectum*, то можливо, що і в складі PVS вони не будуть чинити виражену пошкоджувальну дію. Як було показано на рис. 1, ЕГ був токсичним для *Ch. dissectum* вже у 5%-й концентрації, що може пояснити невисоку інтенсивність флуоресценції відновленого резазурину після дії розчинів, здатних до склування.

Виражене зменшення метаболічної активності (табл. 2) після експозиції клітин у 50 та 75%-му



**Рис. 4.** Інтенсивність флуоресценції резазурину, відновленого клітинами *D. salina*, за дії різних концентрацій PVS: ■ — модифікований PVS 1, ● — PVS 2; \* — різниця значуща відносно контролю,  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Fluorescence intensity of resazurin reduced by *D. salina* cells, under the influence of various concentrations of PVS: ■ — modified PVS1, ● — PVS2; \* — significant difference compared to the control,  $p < 0.05$ .

From a study of the effect of cryoprotectants of different classes of chemical compounds on the viability of microalgae *Ch. dissectum* and *D. salina*, determined by AB-testt, the following was found. The microalgae *D. salina* turned out to be the most resistant to the influence of all mono- and multicomponent cryoprotectants in the studied concentrations. In terms of fluorescence intensity in cell

**Таблиця 2.** Метаболічна активність *Ch. dissectum* за дії модифікованого PVS1 та PVS2

**Table 2.** Metabolic activity of *Ch. dissectum* under the influence of modified PVS1 and PVS2

Розчин, що вітрифікується Vitrification solution	Концентрація PVS, % PVS concentration, %	Метаболічна активність клітин за дії PVS, % відносно контролю Metabolic activity of cells under the influence of PVS, % relative to the control	
		<i>Ch. dissectum</i>	<i>D. salina</i>
Контроль Control	–	100 ± 4,73	100 ± 1,98
PVS1 (модифікований) PVS1 (modified)	50	67 ± 8,18*	94 ± 5,47
	75	39 ± 2,65* #	94 ± 0,76*
PVS2	50	49 ± 4,89*	94 ± 2,60*
	75	43 ± 2,08*	94 ± 3,21*

**Примітки:** \* — різниця значуща відносно контролю, # — різниця значуща порівняно з початковою концентрацією кріопротектора;  $p < 0,05$ .

**Notes:** \* — significant difference compared to the control, # — significant difference compared to the initial concentration of cryoprotectant;  $p < 0.05$ .



розчині PVS2 можна пояснити більш високою концентрацією ЕГ у його складі (7,5 та 11,3% відповідно). Однак дані показники були дещо вищими за такі після дії 75%-го модифікованого PVS1.

Слід зазначити, що висока стійкість культури *D. salina* до дії модифікованого PVS1 і PVS2 очевидно зумовлена її толерантністю до окремих складових цих розчинів.

Таким чином, найменший пошкоджувальний вплив на клітини *Ch. dissectum* чинив 10%-й розчин ГЛ. Обробка зразків розчинами EtOH і ДМСО зменшувала метаболічну активність на 31–33%, ЕГ — на 50%. Інкубація у 75%-му модифікованому PVS1 та 50 і 75%-х розчинах PVS2 призводила до зниження метаболічної активності більш ніж удвічі порівняно з контролем. Найбільш токсичним кріопротектором для культури *D. salina* виявився етиловий спирт. Експозиція клітин у розчинах ДМСО, EtOH, ЕГ та ГЛ зменшувала метаболічну активність на 25%. Інкубація клітин *D. salina* в зазначених концентраціях розчинів PVS не впливала на досліджуваний показник.

Виходячи з отриманих результатів у подальшому необхідно визначити вплив PVS на клітини мікроросточків за різних термінів експозиції, які використовуються у методах вітрифікації.

Результати роботи важливі для розроблення ефективних протоколів кріоконсервування досліджуваних культур за використання повільних швидкостей охолодження. Найбільш перспективними можна вважати розчини ГЛ та ДМСО, які чинили найменшу пошкоджувальну дію на етапі еквілібрації як *Ch. dissectum*, так і *D. salina*.

## Висновки

На підставі отриманих даних встановлено, що клітини *D. salina* більш стійкі до дії усіх досліджуваних кріозахисних розчинів порівняно з клітинами *Ch. dissectum*.

Етиленгліколь навіть у концентрації 5% знижує метаболічну активність клітин *Ch. dissectum* майже у двічі, тоді як експозиція у 10%-му розчині гліцерину виявляє найменш виражену дію. Обробка зразків розчинами етанолу і диметилсульфоксиду знижує метаболічну активність на 31–33% порівняно з контролем. Інкубація клітин *Ch. dissectum* із розчинами, що вітрифікуються, показала найменшу пошкоджувальну дію модифікованого PVS1 у концентрації 50%, зниження метаболічної активності становило 33% порівняно з контролем.

Найбільш токсичним кріопротектором для культури *D. salina* виявився етиловий спирт. Ек-

культура, метаболічна активність не була нижчою за 64% від контрольних значень.

Відповідь мікроалг *Ch. dissectum* на індивідуальні низькомолекулярні криопротектори може пояснити ефект мультикомпонентних криопротективних розчинів на метаболічну активність. Наприклад, якщо ГЛ і ДМСО були б низькотоксичними для *Ch. dissectum*, вони б не мали б помітного пошкоджувального ефекту як частини PVS. Як показано на рис. 1, ЕГ був токсичним для *Ch. dissectum* навіть у 5% концентрації, що могло б пояснити низьку інтенсивність зменшеного резазурину після дії витрифікуючих розчинів.

Помітне зменшення метаболічної активності (Таблиця 2) після експозиції до 50 і 75% PVS2 розчину може бути пояснено вищою концентрацією ЕГ у його складі (7,5 і 11,3%, відповідно). Однак, ці значення були трохи вищими за ті, що були після впливу 75% модифікованого PVS1.

Слід зазначити, що висока стійкість культури *D. salina* до впливу модифікованого PVS1 і PVS2 очевидно зумовлена її толерантністю до індивідуальних компонентів цих розчинів.

Таким чином, найменш пошкоджувальний вплив на клітини *Ch. dissectum* чинив 10% розчин ГЛ. Обробка зразків розчинами EtOH і ДМСО зменшувала метаболічну активність на 31–33%, а ЕГ — на 50%. Інкубація у 75% модифікованому PVS1 та 50 і 75% PVS2 розчинах призводила до більш ніж двохкратного зменшення метаболічної активності порівняно з контролем. Етиловий спирт виявився найбільш токсичним кріопротектором для культури *D. salina*. Експозиція клітин до ДМСО, EtOH, ЕГ та ГЛ зменшувала метаболічну активність на 25%. Інкубація клітин *D. salina* в зазначених концентраціях розчинів PVS не впливала на досліджуваний показник.

Виходячи з отриманих результатів, для подальшого дослідження необхідно визначити вплив PVS на клітини мікроросточків за різних термінів експозиції, які використовуються у методах вітрифікації.

Результати роботи важливі для розроблення ефективних протоколів кріоконсервування досліджуваних культур за використання повільних швидкостей охолодження. Найбільш перспективними можна вважати розчини ГЛ та ДМСО, які чинили найменшу пошкоджувальну дію на етапі еквілібрації як *Ch. dissectum*, так і *D. salina*.

## Висновки

На підставі отриманих даних встановлено, що клітини *D. salina* більш стійкі до дії усіх досліджуваних кріозахисних розчинів порівняно з клітинами *Ch. dissectum*.

Етиленгліколь навіть у концентрації 5% знижує метаболічну активність клітин *Ch. dissectum* майже у двічі, тоді як експозиція у 10%-му розчині гліцерину виявляє найменш виражену дію. Обробка зразків розчинами етанолу і диметилсульфоксиду знижує метаболічну активність на 31–33% порівняно з контролем. Інкубація клітин *Ch. dissectum* із розчинами, що вітрифікуються, показала найменшу пошкоджувальну дію модифікованого PVS1 у концентрації 50%, зниження метаболічної активності становило 33% порівняно з контролем.



спозиція клітин у розчинах диметилсульфоксиду, етиленгліколю та гліцерину зменшує показники метаболічної активності менше ніж на 25%, у розчинах PVS — на 5%.

## Література

1. Adeniyi OM, Azimov U, Burluka A. Algae biofuel: current status and future applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2018; 90: 316–35.
  2. Al-Rikabey MN, Al-Mayah AM. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in BG-11 media using Taguchi method. *J Adv Res Dynamic.* 2018; 10(7): 19–30.
  3. Amenorfenyo DK, Huang X, Zhang Y, et al. Microalgae brewery wastewater treatment: potentials, benefits and the challenges. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019 May 30 [Cited 30.11.22]; 16(11): 1910. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6603649/>
  4. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res.* 2015; 18(5): 422–36.
  5. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In: Bozkurt Y, editor. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences* [Internet]. 2018 Nov 5 [Cited 2022 Oct 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/64165>
  6. Borowitzka MA. Biology of microalgae In: Levine IA, Fleurence J, editors. *Microalgae in health and disease prevention*. Netherlands: Elsevier; 2018. p. 23–72.
  7. Cheregi O, Ekendahl S, Engelbrektsson J, et al. Microalgae biotechnology in nordic countries — the potential of local strains. *Physiol Plant.* 2019; 166(1): 438–50.
  8. Chernobai N, Kadnikova N, Kovalenko I. The role of cold adaptation in cryopreservation of *Dunaliella salina* Teod. microalgae. *Adv Biol Earth Sci.* 2019; 4(2): 119–27.
  9. Chernobai NA, Vozovik KD, Kadnikova NG. Comparative analysis of methods for assessing the safety of *Dunaliella salina* Teodoresco and *Chlorococcum dissectum* Korshikov (Chlorophyta) microalgae cultures after exposure to stress factors. *Algologia.* 2021; 31(4): 353–64.
  10. Day J, Benson E, Harding K, et al. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a pan-european scientific and biotechnological resource (the COBRA project). *CryoLetters.* 2005; 26(4): 231–8.
  11. Gäbler-Schwarz S, Rad Menendez C, Achilles-Day U, et al. Cryopreservation of *Phaeocystis antarctica*. *Cryoletters.* 2013; 34(6): 561–70.
  12. Gangl D, Zedler JA, Rajakumar PD, et al. Biotechnological exploitation of microalgae. *J Exp Bot.* 2015; 66 (22): 6975–90.
  13. Heesch S, Day JG, Yamagishi T, et al. Cryopreservation of the model alga *Ectocarpus* (Phaeophyceae). *CryoLetters.* 2012; 33: 327–36.
  14. Hosseini Tafreshi A, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(1): 14–35.
  15. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46 (3): 205–29.
  16. Ramaraj S, Niranjana J. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int J Curr Sci.* 2013; (5): 67–73.
  17. Shevchenko N, Kovalenko G, Kovalenko I, Stribul T. Discovery of osmotic responses of sweet potato meristems in cryoprotective solutions. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021; 31(2): 180–4.
  18. Tsukazaki H, Mii M, Tokuhara K, Ishikawa K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Rep.* 2000; 19 (12): 1160–4.
- cells almost twice, while exposure in a 10% solution of glycerol causes the least pronounced effect. Treatment of the samples with solutions of ethanol and dimethyl sulfoxide reduces metabolic activity by 31–33% compared to the control. Incubation of cells *Ch. dissectum* with vitrifying solutions showed the least damaging effect of modified PVS1 at a concentration of 50%, the decrease in metabolic activity was 33% compared to the control.
- Ethanol was the most toxic cryoprotectant for *D. salina* culture. Exposure of cells to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol solutions reduces metabolic activity by less than 25%, and by 5% in PVS solutions.

## References

1. Adeniyi OM, Azimov U, Burluka A. Algae biofuel: current status and future applications. *Renew Sustain Energy Rev.* 2018; 90: 316–35.
2. Al-Rikabey MN, Al-Mayah AM. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in BG-11 media using Taguchi method. *J Adv Res Dynamic.* 2018; 10(7): 19–30.
3. Amenorfenyo DK, Huang X, Zhang Y, et al. Microalgae brewery wastewater treatment: potentials, benefits and the challenges. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019 May 30 [Cited 30.11.22]; 16(11): 1910. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6603649/>
4. Best BP. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res.* 2015; 18(5): 422–36.
5. Bhattacharya S. Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. In: Bozkurt Y, editor. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences* [Internet]. 2018 Nov 5 [Cited 2022 Oct 23]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/64165>
6. Borowitzka MA. Biology of microalgae. In: Levine IA, Fleurence J, editors. *Microalgae in health and disease prevention*. Netherlands: Elsevier; 2018. p. 23–72.
7. Cheregi O, Ekendahl S, Engelbrektsson J, et al. Microalgae biotechnology in nordic countries — the potential of local strains. *Physiol Plant.* 2019; 166(1): 438–50.
8. Chernobai N, Kadnikova N, Kovalenko I. The role of cold adaptation in cryopreservation of *Dunaliella salina* Teod. microalgae. *Adv Biol Earth Sci.* 2019; 4(2): 119–27.
9. Chernobai NA, Vozovik KD, Kadnikova NG. Comparative analysis of methods for assessing the safety of *Dunaliella salina* Teodoresco and *Chlorococcum dissectum* Korshikov (Chlorophyta) microalgae cultures after exposure to stress factors. *Algologia.* 2021; 31(4): 353–64.
10. Day J, Benson E, Harding K, et al. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a pan-european scientific and biotechnological resource (the COBRA project). *CryoLetters.* 2005; 26(4): 231–8.
11. Gäbler-Schwarz S, Rad Menendez C, Achilles-Day U, et al. Cryopreservation of *Phaeocystis antarctica*. *Cryoletters.* 2013; 34(6): 561–70.
12. Gangl D, Zedler JA, Rajakumar PD, et al. Biotechnological exploitation of microalgae. *J Exp Bot.* 2015; 66 (22): 6975–90.
13. Heesch S, Day JG, Yamagishi T, et al. Cryopreservation of the model alga *Ectocarpus* (Phaeophyceae). *CryoLetters.* 2012; 33: 327–36.



19. Wang B, Zhang Z, Yin Z, et al. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(3): 604–12.
20. Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A. Vitrification solutions for plant cryopreservation: modification and properties. *Plants* [Internet]. 29 Nov 2021 [Cited 30.11.22]; 10(12): 2623. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/12/2623>
14. Hosseini Tafreshi A, Shariati M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(1): 14–35.
15. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46 (3): 205–29.
16. Ramaraj S, Niran J. Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int J Curr Sci.* 2013; (5): 67–73.
17. Shevchenko N, Kovalenko G, Kovalenko I, Stribul T. Discovery of osmotic responses of sweet potato meristems in cryoprotective solutions. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021; 31(2): 180–4.
18. Tsukazaki H, Mii M, Tokuhara K, Ishikawa K. Cryopreservation of *Doritaenopsis* suspension culture by vitrification. *Plant Cell Rep.* 2000; 19 (12): 1160–4.
19. Wang B, Zhang Z, Yin Z, et al. Novel and potential application of cryopreservation to plant genetic transformation. *Biotechnol Adv.* 2012; 30(3): 604–12.
20. Zamecnik J, Faltus M, Bilavcik A. Vitrification solutions for plant cryopreservation: modification and properties. *Plants* [Internet]. 29 Nov 2021 [Cited 30.11.22]; 10(12): 2623. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/12/2623>

