

579:582.26/.27
Е 70



Национальная академия наук Украины
Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского

В.Н. Еремеев, Р.П. Тренкеншу, Ю.Н. Шокарев

**МОРСКИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ: ПРОБЛЕМЫ
СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И РАЗВИТИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА УКРАИНЫ**

Севастополь 2002

ПРОВ 2010



Национальная академия наук Украины
Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского

Препринт

**МОРСКИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ: ПРОБЛЕМЫ
СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ И РАЗВИТИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА УКРАИНЫ**

В.Н. Еремеев, Р.П. Тренкениш, Ю.Н. Токарев

Институт биологии
южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 4

Севастополь 2002

В.Н. Еремеев, Р.П. Тренкеншу, Ю.Н. Токарев Морские микроводоросли: проблемы сохранения биоразнообразия и развития биотехнологического потенциала Украины / Препринт – Севастополь: ИнБЮМ. – 2003. - 20 с.

Обсуждаются экологические и биотехнологические аспекты проблемы сохранения генофонда морских микроводорослей Черного и Азовского морей. Затронуты вопросы адаптаций в природе и культуре, хранения в коллекциях, криоконсервации и ангидробиоза морских микроводорослей.

Библиогр.: 41 назв.

Рекомендовано к печати

Ученым советом Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
Национальной Академии наук Украины

Ответственный за выпуск

доктор биологических наук А.В. Гаевская

Рецензент

член-корреспондент НАНУ Г.Е. Шульман

Морские микроводоросли: проблемы сохранения биоразнообразия и развития биотехнологического потенциала Украины

Глобальная роль микроводорослей. Микроводоросли – обширная группа разнообразных по таксономическому положению, филогении и физиологии фотосинтезирующих микроорганизмов, включающая прокариотические (цианобактерии) и эукариотические водоросли и насчитывающая по различным оценкам от 30 до 40 тысяч видов [16,34]. Микроводоросли – древнейшие обитатели Земли – обладая высокой экологической вариабельностью, за счет минеральных веществ и энергии Солнца, превратили углекислотную атмосферу в кислородную. Этот процесс сопровождался бурным ростом, в результате которого образовалось огромное количество биомассы, со временем превратившейся в топливо (нефть) и другие полезные ископаемые (осадочные породы). Вместе с этим, микроводоросли явились первичным звеном трофических цепей [8,23]. Глобальная роль микроводорослей в биосфере сохранилась до нашего времени. Микроводоросли вносят около половины в общую фотосинтетическую продукцию растений планеты и являются основой пищевых цепей для более, чем 70% мировой биомассы [18]. Роль микроводорослей для Мирового океана, с сохранением и использованием ресурсов которого связано развитие самого человечества, трудно переоценить.

Экологические проблемы. Напряженная экологическая ситуация во многих районах Мирового океана, связанная с деятельностью человека, выдвигает на первое место проблемы сохранения, воспроизводства и рационального использования имеющихся морских биоресурсов. Длительное загрязнение морей и открытых участков океана малыми дозами химических веществ мутагенного и кумулятивного характера приводит к возникновению «техногенной эпидемии», которая проявляется в нарушении жизненных функций организмов, а также в изменении их генетического кода [3].

Природные популяции микроводорослей, обитая в исторически сложившихся условиях своего биотопа, поддерживают со средой динамическое равновесие в ряду поколений. Однако в настоящее время генофонды многих организмов стремительно меняются за счет увеличения частоты и накопления вредных мутаций, способствующих вымиранию отдельных видов. Бурный рост промышленности и сельского хозяйства привел к значительному изменению среды обитания микроводорослей. В континентальных водоемах и морских водах наблюдается такое явление, как эвтрофикация, которая сопровождается массовым размножением микроводорослей, как правило, одного вида («цветение воды»). Это природное явление достигло значительных размеров, так как его ускоряют сбросы сточных вод [4].

Для Азово-Черноморского бассейна, в последние годы, ситуация усугубляется практически неконтролируемым «освоением» побережья Крыма и северной части морей, которые являются местами обитания уникальных галобных микроводорослей. В этих условиях еще острее становится необходимость поиска путей сохранения отдельных, часто эндемичных, видов морских микроводорослей.

В первую очередь, на наш взгляд, необходима постановка такой проблемы. В целом идеология проблематики сохранения водорослей (альгосозология, как раздел фитосозологии) активно поддерживается украинскими учеными, которые внесли значительный вклад в разработку её теории и практики [5]. Кроме того, на X съезде Украинского ботанического общества (1997 г.) было высказано предположение о том, что уже в начале 21 века может произойти обеднение биологического многообразия фитобиоты, которое породит новые проблемы перед ботаниками. В частности, возможна катастрофическая “синантропизация” флоры Украины [9].

Сегодня можно с полным основанием говорить о проблеме сохранения генофонда морских микроводорослей. Успешное решение этой проблемы невозможно без решения целого ряда других проблем, связанных с морскими микроводорослями. Выделим некоторые из них.

Проблемы адаптации. Одним из направлений сохранения биоразнообразия является повышение устойчивости видов, их адаптации к изменению абиотических факторов среды. К сожалению, механизмы процессов адаптации (биофизические, биохимические, физиологические) большинства видов гидробионтов, в том числе протистов – наиболее многочисленного компонента морской биоты – изучены совершенно недостаточно. Из всего многообразия реакций «поствоздействия» гидробионтов наибольший интерес представляют те, которые, во-первых, проявляются уже в течение первых десятков минут после воздействия поллютантов и, во-вторых, определяются инструментальными методами регистрации наблюдаемых эффектов.

Такими свойствами обладают светящиеся виды пиррофитовых микроводорослей, являющиеся важным звеном фитоценоз Мирового океана. Именно поэтому, в частности, приоритетными признаны экспрессные биофизические методы оценки функционального состояния планктонных сообществ по кинетическим параметрам их свечения [10].

Возможность использования характеристик высвечивания гидробионтов для оценки их физиологического состояния основана на фундаментальном законе: устойчивость любых организмов к внешним воздействиям зависит от состояния их систем энергообеспечения [6,12]. Известно, что для биолюминесценции (ферментативной хемилюминесценции) необходимы большие запасы энергии (41-62 ккал на 1 моль вещества), значительно превышающие энергетический потенциал планктонтов ($10-20 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1}$), что предполагает связь люминесцентных реакций с дыхательной цепью [2]. Такая связь обнаружена у светящихся бактерий - чем больше кислорода потреблялось их колонией, тем интенсивнее они светились [11]. Несколько позднее общность каналов фотосинтеза и биолюминесценции была описана у динофлагеллят [37]. Аналогичная зависимость установлена между уровнем обмена и интенсивностью свечения веслоногих рачков рода *Pleuromamma*. Таким образом, универсальность связи биолюминесценции организмов с их биоэнергетикой очевидна. Это позволяет предположить, что состояние систем энергообеспечения служит индикатором уровня антропогенной нагрузки на гидробионтов и даёт возможность использовать амплитудно-временные характеристики биолюминесценции для целей биомониторинга.

Выбор динофлагеллят, помимо их важности для создания первичной продукции, объясняется также тем, что многие их виды обладают различным типом питания (автотрофным, гетеротрофным, миксотрофным), смена которого может служить одним из признаков (критериев) адаптации вида к изменению характеристик среды. Наконец, многие виды Ругтроphyta (прежде всего из отдела Дупорphyta) обладают способностью к биолюминесценции, характеристики которой служат одним из показателей функционального состояния организма. Для практической реализации данного подхода в Азово-Черноморском бассейне необходимо:

- разработать методику биофизической экспресс - оценки функционального состояния динофлагеллят, обладающих различными типами питания;
- определить характеристики светового излучения автотрофного и гетеротрофного компонентов выбранных природных популяций и культур водорослей;
- провести люминесцентно-цитологический анализ хлоропластов при воздействии поллютантов техногенного происхождения.

Совокупность таких разработок позволит предложить новые методы биофизического экспресс - биотестирования морской среды и экспресс - мониторинга функционального состояния морских планктонных водорослей - составной части генетического фонда фитоцены Украины.

Проблемы биотехнологии микроводорослей. Микроводоросли являются неотъемлемым компонентом фиторесурсов Украины. «Зеленая революция», которая произошла в некоторых странах мира в последней четверти 20 века, коснулась и такого ресурса, как микроводоросли.

Именно в эти годы произошел бурный рост микроводорослевой промышленности. Достаточно сказать, что объём продаж синезеленой водоросли спирулина к концу века достиг 3000 т в год. В это же время наметилось понимание того, что микроводоросли представляют собой слабоизученный биотехнологический потенциал. Действительно, из более 30 000 видов микроводорослей, в практике используется менее 100 видов [16,23,27,34].

Различные виды водорослей служат источниками легкоусвояемого растительного белка, богатого незаменимыми аминокислотами, витаминов[23], полиненасыщенных жирных кислот [38], хлорофилл - каротиноидных комплексов [28], иммуностимуляторов, препаратов бактерицидного и противоопухолевого действия, природных красителей, эфирных масел, стероидов, цитохромов и других веществ [21,22,23,26]. Водоросли используются для производства пищевых продуктов и биологически активных добавок к пище, кормов для сельскохозяйственных животных и водных организмов, лечебно-профилактических и лекарственных препаратов, парфюмерно-косметической продукции и т.д. [20,21,22,23,26,27].

Особое внимание уделяется поиску новых продуцентов биологически ценных веществ и изучению возможности направленного синтеза тех или иных биохимических составляющих клетки [13,23,27]. При этом наиболее привлекательны для внедрения в практику морские микроводоросли, поскольку они характеризуются большим видовым и биохимическим разнообразием, более богатым набором биологически ценных веществ по сравнению с пресноводными видами.

Известно, что биохимический состав клеток существенно зависит от физико-химических условий, в которых находится организм. Изучение роста и метаболизма организмов в управляемой культуре позволяет решать фундаментальные вопросы взаимоотношения организма со средой. Одновременно, управление синтезом биологически ценных веществ – прикладная сторона исследований, связанных с изучением влияния факторов внешней среды на рост клеток и их биохимический состав. В результате управляемого биосинтеза происходит селекция штаммов микроводорослей, т.е. появляется возможность выведения штаммов с заданными физиологическими и биохимическими характеристиками. Здесь также возникает вопрос о сохранности этих свойств при длительном культивировании и хранении штаммов.

Вся история культивирования микроводорослей насчитывает немногим более ста лет. Впервые питательная среда для искусственного выращивания водорослей была предложена Микуэлем [32]. Она состояла из морской воды, в которую добавляли биогенные элементы. Дальнейшее развитие этого направления исследований, в основном, состояло в создании специальных питательных сред для выращивания отдельных видов водорослей путем изменения концентрации биогенных элементов и подбора новых компонентов сред. В результате, кроме питательных сред для интенсивного роста культур, появились рецепты питательных сред для длительного поддержания культур микроводорослей. Разработка таких сред вместе с развитием методов получения альгологически чистых культур позволили создавать коллекции микроводорослей.

Проблемы сохранения генофонда. К настоящему времени альгологами накоплен опыт хранения культур микроводорослей. По крайней мере, можно говорить о сотнях видов культур, хранящихся в коллекциях различных учреждений, как правило, учебных или исследовательских. Кроме того, небольшие коллекции имеют некоторые коммерческие биотехнологические предприятия, которые стремятся сохранить используемые ими в производстве штаммы микроводорослей.

Коллекции. Общее количество коллекций микроводорослей в мире точно неизвестно, однако, они есть практически во всех развитых странах. Руководителем программы COST 49 G.G. Reina собран и опубликован список коллекций культур микроводорослей, которые имеются в Европе. В каталоге представлено 80 европейских коллекций [17,35]. Ясно, что этот список не полный, вероятно, коллекций намного больше. В качестве примеров приведем несколько работ, в которых описаны коллекции микроводорослей.

Одна из старейших коллекций культур микроводорослей, берущая начало с 1913 г., находится в Пражском Карловом университете. Количество линий, содержащихся в коллекции на 1991 г.: Cyanophyta (Cyanobacteria) - 207, микроводоросли - 315, Hepaticae - 62, Musci - 93, Pteridophyta - 12, Lemna - 2 [29].

Коллекция культур микроводорослей (преимущественно почвенных) в университете в Инсбруке (Австрия) содержит более чем 2600 изолятов, в каталоге 379 линий (от 237 видов и 93 родов) [25].

Коллекция культур микроводорослей и простейших в Англии (Ambeleside, Cumbria). С 1991 г. этот Центр сотрудничает с японским Национальным институтом по исследованию среды по широкому кругу взаимных интересов. Они включают: таксономию микроводорослей, биоинформатику, управление коллекцией, сохранение водорослевого биоразнообразия, криосохранение и исследование токсинов цианобактерий [18].

Во Франции (Lab. Microbiol. ORSTOM, Univ. Provence) в 1979 г. была создана коллекция азотфиксирующих сине-зеленых водорослей. В 1991 г. в коллекции было 204 штамма из 21 страны [36].

Одна из крупнейших коллекций морского фитопланктона в США насчитывает около полутора тысяч штаммов микроводорослей (The Provasoli - Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, CCMP).

Коллекция культур микроводорослей в Техасском университете (Аустин) существует около 50 лет. В настоящее время служит национальным источником культур водорослей для исследователей в США и за ее пределами. На использование коллекции нет никаких ограничений. Стоимость культуры для исследовательских и правительственных учреждений США составляет 10 долларов, для всех других пользователей - 25 долларов [39].

В Австралии на о. Тасмания имеется коллекция морских и пресноводных микроводорослей. (выделенных в основном из Австралийских вод), где проводятся исследования по использованию микроводорослей для биотехнологии и аквакультуры [14].

С 1982 г. на Тайване начала функционировать коллекция культур водорослей, используемых в исследованиях по питанию мальков рыб и беспозвоночных. Сейчас в коллекции содержится 31 вид микроводорослей (49 линий) и некоторые виды простейших и ракообразных. Исследования живых кормов включают их морфологию, технику культивирования, состав жирных кислот и питательную ценность [40].

Здесь приведены примеры как некоторых крупных, так и относительно небольших коллекций. В большинстве коллекций, как правило, хранятся культуры одних и тех же видов, часто используемых в научных исследованиях. Выделение редких видов в культуру и разработка питательных сред для их поддержания представляют собой сложную и трудоемкую задачу. Проблемой является также их таксономическая оценка. Даже среди специалистов высокого класса имеются разногласия по поводу видовой или родовой принадлежности микроводорослей, не говоря уже о штаммах. Так, японские специалисты проверили видовую принадлежность штамма микроводоросли из коллекции пресноводных культур Института гидробиологии Китайской Академии Наук, и определенный китайскими специалистами как *Eudorina sp.* В результате исследований выяснилось, что штамм определяется как *Eudorina unicocca* G. M. Smith или *Yamagishiella unicocca* (Rayburn et Starr) [33].

Наиболее крупные коллекции культур микроводорослей Украины – коллекции Института ботаники и Института гидробиологии НАНУ. Национальной коллекции морских микроводорослей на Украине нет. В то же время небольшие коллекции микроводорослей Азовского и Черного морей существуют в различных исследовательских организациях.

Единственная коллекция морских микроводорослей в СССР была создана около 40 лет назад Л.А. Ланской в Институте биологии Южных морей НАНУ. В настоящее время коллекция поддерживается сотрудниками отдела экологической физиологии морских планктонных водорослей (Зав. Отделом – доктор биологических наук З.З. Финенко) и насчитывает 35 видов.

Методы хранения. Способы длительного сохранения культур микроводорослей разнообразны. Культуры хранят в питательных средах длительного хранения, в агаре, альгинатах, иммобилизованными на различных видах матриц из современных пенопластмасс. Сравнительная оценка методов длительного поддержания штаммов микроводорослей сделана в Чехии. Испытывалось хранение клеток, иммобилизованных на различных видах пенопластиков, агаре, альгинате, в питательных средах длительного хранения. Было обнаружено, что жизнеспособность клеток после длительного хранения была видоспецифичной. *Chlorella kessleri* и *Synechococcus leopoliensis* сохранили жизнеспособность практически во всех матрицах. Виды микроводорослей, наиболее часто использованные в испытаниях *Raphidocelis subcapitata* и *Scenedesmus quadricauda*, сохранили жизнеспособность более 80 % на агаре, альгинате и пеностекле. Микроводоросли, хранящиеся на агаре и альгинате, показали самую высокую жизнеспособность и начали расти немедленно. Пеностекло подходило для длительного поддержания, но покрытый пенопластом полиуретан был неподходящим. Использование среды длительного хранения рекомендуется не более, чем для однолетнего поддержания [30].

Однако, проблеме длительного многолетнего хранения культур микроводорослей данными методами пока решить не удалось, так как в процессе длительного хранения этими методами происходит генетический дрейф [31].

Криобиоз. В последние годы интенсивно ведутся работы по сохранению микроводорослей в замороженном состоянии при очень низких температурах. В 1998 г. состоялся первый международный симпозиум по хранению микроводорослей при криогенной температуре [41]. Это указывает на серьезную заинтересованность ученых в решении проблем длительного хранения культур микроводорослей. Криоконсервация, как метод хранения штаммов, разрабатывается для различных видов микроводорослей, включая морские виды, в основном для биотехнологических целей.

Морская микроводоросль *Tetraselmis suecica*, которая широко используется в аквакультуре, может храниться при криогенной температуре и после оттаивания достичь уровня жизнеспособности 65 %, если в качестве криопротектора используется глицерин и выдерживаются соответствующие режимы замораживания (перед погружением в жидкий азот) и оттаивания культуры [24]. Разработан метод длительного криосохранения морских диатомовых водорослей. В частности, для микроводоросли *Thalassiosira weissflogii* предложен комбинированный метод, состоящий в применении в качестве криопротекторов 1 М. пирролидина, льфакарбоновая кислота (в которой клетки культивировали 24 часа) и 2 М. метанол и двухступенчатый режим оттаивания. Уровень жизнеспособности после длительного хранения достигал 70% [31].

На жизнеспособность морских микроводорослей влияет возраст культуры, используемой для хранения при криогенных температурах. Результаты исследований на пяти видах водорослей *Rhodomonas baltica*, *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis chuii*, *Nannochloris atomus*, *Nannochloropsis gaditana*, показали, что жизнеспособность клеток видоспецифична, зависит от солености и концентрации криопротекторов, варьирует в больших пределах и изменяется от полной гибели до 100% [15].

Для пресноводных микроводорослей разработан двухступенчатый режим замораживания, обеспечивающий криосохранение культур в течение 22 лет, с уровнем жизнеспособности после размораживания до 95% [19].

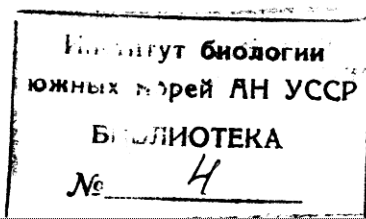
Ангидробриоз. Сравнительно мало исследований проведено по использованию при хранении микроводорослей метода ангидробриоза (или «сухого» анабиоза). Литературные данные по этому вопросу противоречивы. Английскими исследователями проведены опыты по реактивации *Chlorella emersonii* после хранения высушенного материала в течение одного года. Уровень жизнеспособности для этого вида составил 0.1 % после повторной гидратации, все другие высушенные организмы, исследованные в этих опытах, реактивировать не удалось. Кроме того, никакая реактивация не наблюдалась у любых видов микроводорослей после хранения в сублимированном состоянии [19].

Более удачные опыты по реактивации микроводорослей из состояния ангидробриоза проведены с *Chlorella vulgaris*. Разработанная автором схема реактивации позволяет высушивать, хранить и реактивировать высушенные клетки с высокой степенью жизнеспособности, причем относительно простыми методами [7].

Перспективы. С 1990 г. в Институте биологии южных морей НАН Украины разрабатываются технологии интенсивного культивирования ряда ценных микроводорослей. Практическим воплощением научных разработок являются технологии сезонного выращивания их в культиваторах открытого типа. Это связано с необходимостью уменьшения себестоимости получаемой биомассы, которая в основном определяется высокими энергозатратами в зимнее время при круглогодичном культивировании. Приуроченность культивирования к летнему сезону требует сохранения необходимых штаммов для подготовки определенного количества инокулята для начала массового выращивания. Кроме того, необходимо иметь жизнеспособный резерв культур при потере управления процессами выращивания. Для небольших хозяйств обычные способы сохранения штаммов микроводорослей являются дорогостоящими, поэтому возникает необходимость поиска других приемов. Один из таких приемов может базироваться на давно известной способности некоторых организмов переходить в воздушно - сухое состояние без образования специальных защитных структур. Экспериментально показано, что в этом случае повышается прочность молекул белков и их комплексов с другими макромолекулами [1]. Такой способ стабилизации клеток имеет большое значение при заселении видом местообитаний с периодическим отсутствием влаги и может быть использован при разработке промышленных способов консервирования микроорганизмов, а также при создании в целях сохранения генофонда ценных объектов специальных музеев (хранилищ) ангидробиозных культур.

В отделе биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ начаты работы по получению препаратов микроводорослей с низким, не повреждающим клетки содержанием воды, разработке оптимального режима хранения и возврата микроорганизмов из состояния ангидробิโอ́за к активной жизнедеятельности. На первом этапе исследований, в качестве модельного объекта были выбраны образцы сине - зеленой водоросли *Spirulina platensis* разного срока хранения (1 - 5 лет), выращенных в лабораториях и на плантациях России и Украины, а также аптечные таблетированные образцы импортного производства. Результатами первых опытов явилась реактивация 11 образцов из 15. Необходимо заметить, что в импортных образцах вместе со спиролиной были реактивированы и сопутствующие виды сине-зеленых микроводорослей, которыми, вероятно, заражены культуры производителей. Два вида переведены в альгологически чистую культуру и сохранены в коллекции. По предварительной оценке они могут относиться к родам *Oscillatoria* и *Synechococcus*. В настоящее время работы подобной направленности продолжаются.

Таким образом, глобальная задача сохранения генофонда низших растений имеет экспериментальные предпосылки для ее успешного решения. Эвентуальная перспектива видится в создании хранилища культур морских микроводорослей, который обеспечит возможность в любой момент вырастить нужный вид водорослей до необходимого количества для научных или практических целей.



Литература

1. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. - Л.: Наука. - 1985. - 317 с.
2. Гительзон И.И., Чумакова Р.И., Филимонов В.С. и др. Билюминесценция в море. - М.: Наука. 1969. - 184 с.
3. Израэль Ю.А., Цыбань А.В. Антропогенная экология океана. - Л.: Гидрометеиздат. 1989. - 528 с.
4. Капинос П.И., Панасенко Н.А. Охрана природы. - К: Вища школа. 1989. - 255 с.
5. Кондратьева Н.В. О принципах отбора видов водорослей Украины, подлежащих первоочередной охране // Альгология. - 2002. - Т. 12. №1. С. 3-23.
6. Конькова А.Ф., Мигай И.А., Шехаева О.М. и др. Физико-химические закономерности адаптации организма к экстремальным воздействиям // Изв. АН СССР. Сер. биол. - 1987. - №1. - С. 104-118.
7. Нестеренко Т.В. Реактивация микроводорослей из состояния сухого анабиоза // Параметрическое управление биосинтезом низших растений. - Новосибирск: Наука. 1982. - С. 139-143.
8. Пульц О. Пути пополнения пищевых ресурсов за счет использования водорослей // Альгология. - 1999. - Т.10. №3. - С.341-349.
9. Ситник К.М. Світова і Українська ботаніка в ХХ столітті та перспективи її розвитку в третьому тисячолітті // Матеріали Х з'їзду Укр. ботан. тов-ва. -Київ. 1997. - С. 3-6.
10. Хоружая Т.А., Шляхова Н.А., Слуцкая Н.В., Кондрух В.В., Трофимчук М.М. Методы наблюдений за состоянием планктонных сообществ. // Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. - Л.: Гидрометеиздат. 1989. - Вып.2. - С. 11-16.
11. Чумакова Р.И., Егорова А.А. Люминесценция и активность оксидантных энзимов светящихся бактерий // Микробиология. - 1984. - Т.33. - С. 423-427.
12. Шмидт - Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда. Т.1. - М.: Мир. 1982. - 400 с.
13. Apt K.E., Behrens P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology. // J. Phycol. - 1999. - Vol. 35. no. 2. P. 215-226.
14. Blackburn S.I., Bolch C.J.S., Brown M.R., Leroi J.M., Volkman J.K. The CSIRO collection of living microalgae: the importance of culture collections and microalgal biodiversity to aquaculture and biotechnology // Marine microorganisms for industry: Proceedings of the meeting held in Brest on the 17-19 September 1997. Eds.: Le Gal Y., Muller Feuga A. - Plouzane, France: IFREMER. 1998. - №. 21. - P. 150-159.

15. *Canavate J.P., Lubian, -L.M.* Effects of culture age on cryopreservation of marine microalgae // *Eur. J. Phycol.* - 1997. - Vol. 32, no. 1. - P. 87-90.
16. *Chaumont D.* Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture // *J. Appl. Phycol.* - 1993. - Vol. 5. - P. 593-604.
17. *Culture collections of microalgae* // COST - 49. European Commission. 1996. P. 223 - 229.
18. *Day J.G., Benson E.E., Fleck R.A.* In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research // *Cell. Dev. Biol. Plant.* - 1999. - Vol. 35, no. 2. - P. 127-136.
19. *Day J.G., Watanabe M.M., Morris G.H., Fleck R.A., McLellan M.R.* Long-term viability of preserved eukaryotic algae // *J. Appl. Phycol.* - 1997. - Vol. 9, no. 2. - P. 121-127.
20. *Dvorkin S.A.* A factory of commercial cultivation of microalgae // *Algology*. / Eds. P. Kretschmer, O. Pulz, C. Gudin. - Potsdam (Germany): Print Express K. Beyer. 1992. - P. 91 -92.
21. *European Society of Microalgal Biotechnology: 2nd European Workshop "Biotechnology of microalgae".* 11 - 12 Sept., 1995. - Bergholz: IGV. 1995. - 154 p.
22. *European Society of Microalgal Biotechnology // 3rd European Workshop "Biotechnology of Microalgae": Abstracts.* 16-17 June, 1997. - Bergholz: IGV. 1997. - 43 p.
23. *European Society of Microalgae // 4th European Workshop "Biotechnology of Microalgae": Abstracts.* 29-30 May, 2000. - Bergholz: IGV. 2000. - 85 p.
24. *Fenwick C., Day J.G.* Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes // *J. Appl. Phycol.* -1992. -Vol. 4, no. 2. - P. 105-109.
25. *Gaertner G.* ASIB - Die sammlung von algenkulturen am Institut fuer Botanik der Universitaet Innsbruck (Oesterreich) Kulturenverzeichnis 1996 // *Ber. Naturwiss. Med. Ver.* - 1996. - Vol. 83. - S. 45-69.
26. *Gudin C.* Antioxidants from microalgae // 2nd European Workshop "Biotechnology of Microalgae", 11-12 Sept. 1995. - Bergholz: IGV. 1995. - P. 61-69.
27. *8th International Conference on Applied Algology. Algae and Human Affairs In the 21st. Century: Abstr.* 26 Sept. -1 Oct., 1999. -209 p.
28. *Loest K., Pulz O.* Natural Colorants of Microalgae // 2nd European Workshop "Biotechnology of Microalgae". - Bergholz: IGV. 1995. -P. 74-77.
29. *Lukavsky J., Cepak V., Komarek J., Kasparkova M., Takacova M.* Catalogue of algal and cyanobacterial strains of culture collection of autotrophic organisms at Trebon. // *Arch. Hydrobiol. Suppl.* - 1992. -Vol. 91. - P. 59-112.
30. *Marsalek B., Rojickova-Padrtova R.* Long-term maintenance of algal strains for use in bioassays and biotechnology // *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* - 1998. -Vol. 124. - P. 121-136.

31. Meyer M.A. Cryopreservation of a marine diatom // Diss. Abst. Int. Pt. B. Sci. and Eng. 1986. -Vol. 47. no. 1.- P. 1-125.
32. Miquel P. De la Culture artificielle des Diatomées // Le Diatomiste.- 1890-1893. -№ 1.- P.73-165.
33. Nozaki H., Song Lirong, Liu Yongding, Hiroki M., Watanabe M.M. Taxonomic re-examination of a Chinese strain labeled 'Eudorina sp.' (Volvocaceae, Chlorophyta) based on morphological and DNA sequence data // Phycol. Res. – 1998. -Vol. 46.- P. 63-70.
34. Ordog V., Pulz O. Potential use of microalgae in the crop production // 2nd European Workshop "Biotechnology of Microalgae".- Bergholz: IGV. 1995.- P. 123-126.
35. Reina G.G. Algae, Algologists, Companies, Culture Collections and Herbaria in European Countries. COST - 49.- European Commission. 1996. – 229 p.
36. Roger P.A, Ardales S. The IRRI blue-green algae collection and computerized information on the strains available for distribution // J. Appl. Phycol. -1991. -Vol. 3, no. 4.- P. 375-376.
37. Soli G. Bioluminescent cycle of photosynthetic dinoflagellate // Limnol. Oceanogr. – 1966.- Vol. no. 3.- P. 355-363.
38. Springer M., Franke H., Pulz O. Gamma-Linolenic acid from *Spirulina platensis*- Improvement of product and composition of the lipid extracts // 2nd European Workshop "Biotechnology of Microalgae." - Bergholz: IGV. 1995. - P. 82-85.
39. Starr R.C., Zeikus J.A. UTEX - the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 list of cultures // J.-Phycol. -1993. -Vol. 29, no. 2 suppl. - P. 106.
40. Su H.M.; Su M.S.; Liao I.C. Collection and culture of live foods for aquaculture in Taiwan // Hydrobiologia.- 1997. -Vol. 358, no. 1-3. P. 37-40.
41. Surek B. Meeting rep.: Intern. Symp. on the Cryopreservation of Algae. Austin, Texas, USA, Apr. 16-17, 1998 // Protist.- 1998 -Vol. 149, no. 3.- P. 201-205.

*Институт биологии южных морей НАН Украины
г. Севастополь*