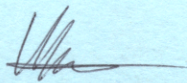


**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО**

**ХАРЧУК
ИРИНА АЛЕКСЕЕВНА**



УДК 579:582.26/.27:57.082.5

**АНГИДРОБИОЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
КАК СПОСОБ СОХРАНЕНИЯ ИХ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ**

03.00.17 – гидробиология

• Автореферат
диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2008

Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Тренкеншу Рудольф Павлович,
Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
НАН Украины,
и. о. заведующего отделом биотехнологий и
фиторесурсов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Костиков Игорь Юрьевич
Киевский национальный университет им. Т.Г. Шевченко
заведующий кафедры ботаники

доктор биологических наук,
Рябушко Виталий Иванович
Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
НАН Украины
заведующий отделом морской фармакологии и

2008 г. в 10⁰⁰ часов на заседании
4.01 при Институте биологии южных
стополь, пр. Нахимова, 2

блиотеке Института биологии южных
ь, пр. Нахимова, 2

08 г.

Гавиш Г. А.В. Гаевская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Микроскопические водоросли – обширная группа разнообразных по таксономическому положению, филогении и физиологии фотосинтезирующих микроорганизмов, включающая прокариотические (цианобактерии) и эукариотические водоросли и насчитывающая по разным оценкам от 30 до 40 тысяч видов (Еремеев и др., 2002; Chaumont, 1993; Ordog, Pulz, 1995). Водоросли богаты белками, аминокислотами, витаминами, полиненасыщенными жирными кислотами, пигментами, эфирными маслами, стеаринами, иммуностимуляторами и другими биологически активными соединениями. Являясь неотъемлемым компонентом фиторесурсов и выполняя важную роль в природе, микроводоросли приобрели существенное значение в практической жизни человека. Обоедение их видового разнообразия может привести к необратимой потере не только сырьевых, кормовых, пищевых, но и генетических ресурсов.

Проблема сохранения и воспроизводства биоразнообразия морской среды наиболее актуальна в условиях нестабильного состояния прибрежных экосистем. С другой стороны, в связи с развитием биотехнологии и возможностью использования отдельных видов микроводорослей для различных практических целей (Еремеев и др., 2002; Sommer et al., 1990; Skulberg, 2000; Pulz, Gross, 2004) возникла необходимость содержания коллекций, обеспечивающих сохранение ценных свойств культивируемых штаммов.

Одной из важных задач современной биологии является надёжное сохранение культур микроводорослей и создание генетических банков штаммов. В альгологической практике применяется широкий спектр методов, позволяющих сохранять микроводоросли в жизнеспособном состоянии: содержание на жидких средах длительного хранения (Владимирова, Игнатьевская, 1966; Marsalek et al., 1998), агаре, альгинате (Chen, 2001, 2003), при помощи лиофилизации, криосохранения с использованием защитных сред и криопротекторов (Айздайчер, 1987; Meyer, 1986; Caffavate et al., 1995; Day et al., 1997; Surek, 1998; Alexandra et al., 1999; Poncet et al., 2003). Однако, при использовании этих методов происходит изменение морфологических и функциональных свойств, а также измельчание клеток сохраняемых культур. Кроме того, поддержание культур в жизнеспособном состоянии является трудоёмким процессом и требует дорогостоящего оборудования.

Хранение микроводорослей, переведённых в состояние ангидробิโอ́за путём их обезвоживания, простой и экономически выгодный способ. Ангидробиоз – глубокое и длительное торможение метаболизма, обратимое при благоприятных условиях и достаточно распространённое явление в природе. Переход клеток в

ангидробиотическое состояние, выход из него и восстановление полной жизнеспособности представляет общебиологический интерес.

Исследований по ангидробиозу микроводорослей крайне мало. Основная часть экспериментальных работ проведена на бактериях и дрожжах. Поэтому разработка методов длительного хранения микроводорослей остается важной и сложной проблемой, решение которой невозможно без изучения процессов происходящих при де- и регидратации вегетативных клеток, что возможно лишь комплексными методами исследования.

Дальнейший поиск способов длительного хранения микроводорослей обусловлен развитием и возрастающей потребностью биотехнологий в постоянном наличии жизнеспособных и стабильных культур, а также связан с проблемами сохранения биоразнообразия флоры Украины.

Связь работы с программами, темами, планами. Работа выполнена в отделе биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ в рамках исследований по следующим темам: «Разработка научных основ биотехнологий воспроизводства и использования морских ресурсов» (№ гос. регистрации 0101U001448, 2002-2005 гг.), «Разработка технологий культивирования и повышения адаптационной способности морских и пресноводных микроводорослей с целью сбережения существующего генетического фонда растений и рационального использования фиторесурсного потенциала Украины» (№ гос. регистрации 0102U004004, 2002-2006 гг.). В перечисленных темах диссертант был ответственным исполнителем.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование ангидробиоза у микроводорослей и разработка метода их длительного хранения в жизнеспособном состоянии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- определить оптимальную температуру перевода микроводорослей в состояние ангидробиоза;
- исследовать изменчивость морфометрических и биохимических характеристик микроводорослей и выбрать критерии оценки их жизнеспособности в состоянии ангидробиоза;
- оценить жизнеспособность клеток микроводорослей в состоянии ангидробиоза при различных сроках хранения;
- разработать метод реактивации микроводорослей из состояния ангидробиоза в активную культуру.

Объект исследования – альгологически чистые культуры *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Nordst.) Geitler, *Dunaliella salina* (Dunal) Teod, *Porphyridium*

cruentum Naeg, *Synechococcus elongatus* Nageli, *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin из коллекции отдела биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины.

Предмет исследования – ростовые, биохимические и морфометрические показатели характеристик микроводорослей в зависимости от условий дегидратации и реактивации.

Методы исследования. Фотоколориметрические и спектрофотометрические методы определения оптической плотности культур, содержания в клетках белка, свободных нуклеотидов, РНК, ДНК, хлорофиллов и суммарных каротиноидов; объемно-весовой метод определения липидов; метод расчета объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей; общепринятые расчетные методики определения скоростей роста культур; метод дифференциального окрашивания клеток, электронно-микроскопический метод исследования дегидратированных клеток. Математическая и статистическая обработка данных выполнена с использованием компьютерных программ для ПК.

Научная новизна полученных результатов. Впервые разработан метод длительного хранения микроводорослей без применения питательных сред, включающий: перевод клеток в состояние ангидробиоза, их сохранение в дегидратированном состоянии и последующее выведение в активную культуру. Метод апробирован на про- и эукариотических микроводорослях: морских, галобных и пресноводных видах. Впервые проведена сравнительная оценка морфометрических характеристик клеток *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*, *Synechococcus elongatus*, *Phaeodactylum tricornerutum* и биохимического состава *S. platensis*, *D. salina* до и после обезвоживания, в зависимости от температуры дегидратации и сроков хранения. Впервые выполнена оценка жизнеспособности клеток, находящихся в состоянии ангидробиоза в течение разного периода времени. Изучены ростовые и биохимические показатели реактивированных микроводорослей в зависимости от продолжительности пребывания культур в состоянии ангидробиоза. Установлены пределы остаточной влажности, при которой сохраняется жизнеспособность микроводорослей в состоянии ангидробиоза.

Практическое значение полученных результатов. Разработанный метод длительного сохранения микроводорослей успешно используется в Институте биологии южных морей, на базе которого создано единственное в Украине хранилище ангидробиозных культур: заложено на длительное хранение более 100 образцов обезвоженных культур микроводорослей (*Spirulina platensis*, *Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Tetraselmis viridis*, *Synechococcus elongatus*, *Oscillatoria amoena*). Оптимизация метода даёт

возможность перевести в состояние ангидробриоза микроводоросли, относящиеся к разным систематическим отделам. Метод может быть рекомендован для применения в научных и учебных учреждениях, а также в биотехнологиях, где требуется длительное сохранение штаммов музейных культур.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Соискателем самостоятельно сформулированы задачи и выбраны методики исследований, выполнен весь комплекс экспериментальных работ по культивированию микроводорослей и определению их морфометрических, биохимических, ростовых характеристик; проведена обработка и обобщение результатов, а также статистический анализ полученных данных.

В работах, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоял в обсуждении целей, задач и методов исследований, проведении экспериментов, анализе результатов и обобщении материалов. В диссертации использованы данные, полученные автором лично. Права соавторов публикаций не нарушены.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на 11 научных конференциях: III Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (г. Харьков, 2005); Международной конференции «Проблемы биологической океанографии XXI века» (г. Севастополь, 2006); юбилейной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Биоразнообразие. Экология. Эволюция. Адаптация.» (г. Одесса, 2003, 2007); на конференциях молодых учёных по проблемам Чёрного и Азовского морей «Понт Эвксинский III, VI, IV» (г. Севастополь, 2003, 2005, 2007); «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (г. Канев, 2004; г. Умань, 2005; г. Киев 2007); Международной конференции «Актуальные проблемы ботаники, экологии и биотехнологии» (г. Киев, 2006), а также на научных семинарах отдела биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины, на заседании Украинского ботанического общества (г. Севастополь, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ; из них 6 статей (4 без соавторов) в научных изданиях, рекомендованных ВАК Украины, и 14 – в научных сборниках, материалах и тезисах международных конференций.

Структура работы. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти разделов, выводов, списка литературы включающего 219 источников (в том числе иностранных – 135) и приложений А, Б. Текст иллюстрирован 18 таблицами и 40 рисунком.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе представлен краткий обзор истории изучения анабиоза у микроорганизмов, семян и спор растений. Рассматриваются основные закономерности анабиоза, обсуждаются вопросы терминологии. Подробно описаны морфологические и биохимические изменения, происходящие в вегетативных клетках микроорганизмов и растений при дегидратации, регидратации и реактивации. Изучены и обобщены методы длительного хранения микроорганизмов в мировых коллекциях. Проанализировано современное состояние проблемы сохранения микроводорослей и сделан вывод о необходимости поиска и выбора метода их длительного хранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом исследования послужили 5 видов микроводорослей, культивируемых в лабораторных условиях в отделе биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины в период с 2002 по 2006 гг. при непосредственном участии автора. По стандартным методикам был проведен морфометрический анализ клеток водорослей (1500 проб) и биохимический анализ, включающий определение хлорофиллов, суммарных каротиноидов и липидов, белков, свободных нуклеотидов, РНК и ДНК (2103 пробы); определена остаточная влажность культур (1209 проб). По оригинальной методике выполнена реактивация микроводорослей из состояния ангидробиоза (510 проб). Полученные результаты и выводы подтверждены обширным объемом материала и сопровождаются необходимой оценкой достоверности.

В качестве модельных объектов исследования использовали цианопрокариот *Spirulina platensis* и зелёную микроводоросль *Dunaliella salina*. Метод апробирован на цианопрокариоте *Synechococcus elongatus*, красной микроводоросли *Porphyridium cruentum* и диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricorutum*. Обоснованием для выбора объектов было различное таксономическое положение видов микроводорослей и перспективность применения в биотехнологии.

Альгологически чистые культуры прокариотических микроводорослей выращивали на среде Zarouk (Faucher et al., 1979), зелёные — на среде Ben-Amotz (Shaish et al., 1990), диатомовые и красные — на среде Тренкеншу (Тренкеншу и др., 1981) методом накопительной культуры в условиях круглосуточного освещения. Интенсивность освещения на поверхности среды в культиваторах с *S. platensis* составляла 10,7 кЛк, для *D. salina*, *Ph. tricorutum*, *S. elongatus*, *P. cruentum* — 8 кЛк. Интенсивность освещения оценивали по методике Т. Я. Чуриловой (1992). Температура питательной среды находилась в пределах 20–25°C. Равномерное

перемешивание суспензии водорослей осуществляли посредством барбатиrowания воздуха с помощью компрессорной установки, скоростью 0,5 л воздуха в 1 мин. Рост культур регистрировали фотометрическим методом по оптической плотности суспензии водорослей в области 750 нм (D_{750}), измеряемой на фотоэлектрокалориметре КФК-2 в кюветах с рабочей толщиной поверхности 5 мм.

Концентрирование культур проводили на стационарной фазе роста: трихомы *S. platensis* при помощи планктонного сита 100–105 ПЭ (Richmond, 1990), с последующим промыванием дистиллированной водой; клетки *D. salina*, *Ph. tricornutum*, *P. cruentum*, *S. elongatus* - центрифугированием (3000 об./мин) на лабораторной центрифуге ОПН-3-УХЛ 42. Пасту водорослей промывали изотоническим раствором углекислого аммония (Воронова, 1994).

Состояние ангидроброза клеток достигали тремя способами: 1) 0,1 мл суспензии водорослей наносили на покровное стекло и высушивали в термостате при температуре 30 и 60°C в течение 24 ч; 2) такой же объем культуры дегидратировали в эксикаторе с силикагелем при комнатной температуре в темноте, в течение 24 ч; 3) сконцентрированные клетки микроводорослей делили на две части; одну из них отмывали от солей. Затем каждую половину пробы делили на три части и обезвоживали в термостате при температуре 30, 60, 70°C в течение 24 ч. Обезвоженные клетки микроводорослей хранили в темноте в герметично закрытых полиэтиленовых упаковках при температуре окружающей среды 18–20°C. Контролем служили культуры не подвергавшиеся обезвоживанию.

Пробы микроводорослей обрабатывали по схеме комплексного химического анализа гидробионтов (Копытов и др., 1985). Массовую долю белка в водорослях определяли по методике Лоури (Lowry et al., 1951), содержание пигментов – спектрофотометрическими методами на приборе СФ – 2000 (Rowan, 1989). Хлорофилл (ХЛ) *a* и *b* из влажных клеток *S. platensis* и *D. salina* экстрагировали 100 % ацетоном. Для расчета его концентрации в клетках *S. platensis* использовали специфический коэффициент экстинкции равный $88,15 \text{ дм}^3 \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (при $\lambda = 663 \text{ нм}$) (Jeffrey, Humphrey, 1975). В экстрактах из клеток *D. salina* оптические плотности регистрировали при 662 и 644 нм, для расчета использовали формулы (Большой практикум..., 1975). Хлорофилл *a* и *b* из сухих клеток *S. platensis* и *D. salina* экстрагировали 90 % ацетоном; оптическую плотность полученных супернатантов регистрировали для *S. platensis* при длине волны 663 нм (Jeffrey, Humphrey, 1975), для *D. salina* при – 664 и 647 нм (Rowan, 1989). Каротиноиды (КР) оценивали в суммарной вытяжке пигментов: во влажной культуре зелёных водорослей в области 440,5 нм (Большой практикум..., 1975), а в сухой – в области 480 нм (Rowan, 1989). Для *S. platensis* концентрацию каротиноидов определяли по поглощению в области

480 нм (Rowan, 1989). Общее содержание липидов находили весовым методом (Методы..., 1975). Количество свободных нуклеотидов (СН), РНК и ДНК определяли спектрофотометрическим методом (Спирин, 1958). Регистрируемые показатели химического состава клеток выражали в пересчете на сухую массу (СМ) микроводорослей и процент их от органической массы. Зольность определяли весовым методом после сжиганием навесок микроводорослей в муфельной печи при температуре 600°C до постоянного веса. Влажность в обезвоженных культурах определяли стандартным методом доведения до постоянной массы (Методы..., 1975).

Выявление живых и мертвых клеток микроводорослей проводили методом дифференциального окрашивания клеток метиленовым синим, эозином и трипановым синим (Методы..., 1975) с помощью светового микроскопа. Одновременно учитывали количество реактивируемых клеток и определяли долю жизнеспособных клеток. Под жизнеспособностью подразумевали способность микроводорослей эндогенно поглощать краситель. Критерием жизнеспособности также был рост микроводорослей на жидких питательных средах. Для количественного учёта роста микроводорослей в культуре использовали камеру Горяева (Методы..., 1975).

Морфологические исследования проводили с использованием растрового электронного микроскопа JSM-6060 LV (фирмы JEOL, Япония) и светового микроскопа Axiostar plus (CARL ZEISS, Германия). Традиционные методы подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии приводят к обводнению препарата. Чтобы избежать обводнения клеток при их химической фиксации, к дискам-подложкам приклеивали гранулы водорослей, обезвоженных обычным способом. Затем образцы подвергали напылению металла (Ровенский, 1979).

Объёмы, площади поверхности микроводорослей рассчитывали по формулам (Брянцева, 2005; Брянцева, и др., 2005) с помощью программы «Plankton.2». Ростовые показатели водорослей на различных фазах развития периодической культуры вычисляли по уравнениям приведённым в работе Р. П. Тренкеншу (2005).

Достоверность результатов оценивали по критерию Стьюдента (Лакин, 1973). Статистическую обработку данных выполняли с помощью стандартных программных пакетов для ПК.

В работе, согласно правил “Международного ботанического кодекса”, применена традиционная номенклатура (Кондратьева, 2001).

ПЕРЕВОД МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В СОСТОЯНИЕ АНГИДРОБИОЗА

Морфометрические изменения клеток микроводорослей при обезвоживании. В разделе приведены обобщенные результаты экспериментальных данных, которые указывают на видоспецифичные изменения морфометрических характеристик клеток водорослей (длины, ширины, объема, площади) во время их обезвоживания.

Показано, что обезвоживание *S. platensis* сопровождалось статистически значимым уменьшением ширины клеток трихом на 28 % ($t = 7,98 > t_{05} = 2,04$) при температуре 30°C, на 31 % ($t = 9,05 > t_{05} = 2,02$) при температуре 60°C, на 25 % ($t = 7,29 > t_{05} = 2,02$) при дегидратации на силикагеле и увеличением их длины на 22% ($t = 2,37 > t_{05} = 2,05$) при температуре 60°C по сравнению с контролем, тогда как при температуре 30°C и комнатной температуре на силикагеле возрастание длины клеток было статистически незначимым 2–3 % ($t = 0,37 < t_{05} = 2,04$ и $t = 0,26 < t_{05} = 2,05$). Толщина и объем трихомов после обезвоживания сокращались примерно в 2 раза. Полученные результаты подтверждены электронно-микроскопическими исследованиями. Таким образом, обезвоживание *S. platensis* независимо от способа дегидратации приводит к уменьшению размеров клеток и трихомов по сравнению с контрольной культурой водорослей.

Обезвоживание *D. salina* приводило к изменению формы и объема клеток. Наиболее существенные морфометрические изменения наблюдали у водорослей, обезвоженных при температуре 60°C: диаметр клеток сокращался на 36 % ($t = 12,41 > t_{05} = 1,98$), при этом их длина уменьшалась на 24 % ($t = 7,42 > t_{05} = 1,98$) по сравнению с контролем. Световая микроскопия позволила выявить в обезвоженных культурах клетки с поврежденными оболочками; при использовании электронного микроскопа также были обнаружены бесформенные клетки, не имеющие четких очертаний. В зависимости от условий обезвоживания была проведена оценка изменчивости формы клеток водорослей. Изучение обезвоженных образцов *D. salina* показало, что в культуре, дегидрированной при 30°C, доминировали клетки шаровидной формы, которые сохраняли способность к восстановлению жизнедеятельности в течение 2-х дней после дегидратации. В культуре, обезвоженной при температуре 60°C и на силикагеле, преобладала несвойственная для данного вида форма клеток (шар + параболоид), при последующей реактивации они не восстанавливались. Во всех образцах были выявлены цистированные клетки. Таким образом, проведенные исследования показали, что обезвоживание *D. salina* при высоких значениях температуры приводит к необратимым последствиям. Благодаря инцистированию данный вид переживает неблагоприятные условия окружающей среды, как природные, так искусственно созданные.

Изменения формы и размеров клеток при дегидратации были зарегистрированы у морских видов микроводорослей: *P. cruentum*, *Ph. tricornutum*, *S. elongatus*. Результаты морфометрических измерений регистрировали при обезвоживании статистически достоверное уменьшение размеров клеток. Так, диаметр клеток *P. cruentum* уменьшался на 25 % ($t = 9,68 > t_{05} = 2,00$) по сравнению с контролем, при этом соответственно происходило снижение объема и площади их поверхности в 2 раза. В культуре *S. elongatus* так же, как и у *S. platensis* во время дегидратации отмечено статистически достоверное сокращение ширины клеток на 20 % ($t = 7,31 > t_{05} = 2,00$) при их незначительном удлинении на 5 % ($t = 1,04 < t_{05} = 2,00$) по сравнению с морфометрическими показателями клеток до обезвоживания.

Диапазон колебаний морфометрических характеристик размеров клеток *Ph. tricornutum* во время дегидратации не превышал одного микрона, однако эти изменения были статистически значимыми. Ширина клеток уменьшалась на 5 % ($t = 2,12 > t_{05} = 2,00$), длина – на 11 % ($t = 5,54 > t_{05} = 2,00$), а объем – на 18 % ($t = 2,74 > t_{05} = 2,00$); при этом площадь поверхности сокращалась на 13 % ($t = 3,31 > t_{05} = 2,00$) по сравнению с контрольными образцами. Электронно-микроскопические исследования *Ph. tricornutum* позволили обнаружить у обезвоженных клеток складчатость поверхности, образование небольших углублений или выпячивания в виде пузырьков различных форм и размеров.

Изменение биохимического состава клеток микроводорослей при обезвоживании. Показано, что дегидратация культур микроводорослей сопровождалась изменением их биохимического состава. После обезвоживания у *S. platensis* выявлено статистически значимое снижение содержания свободных нуклеотидов на 56 % ($t = 5,84 > t_{05} = 2,78$) и повышение содержания РНК на 41,5 % ($t = 4,30 > t_{05} = 2,78$), белка на 33 % ($t = 59,25 > t_{05} = 2,78$) по сравнению с биохимическими показателями до дегидратации (рис. 1. А). Статистически незначимо снизилось содержание пигментов: ХЛ *a* – на 3 %, КР – на 15 % ($t = 2,29 > t_{05} = 2,78$), суммарных липидов – на 32 % ($t = 2,69 > t_{05} = 2,78$); тогда как ДНК повысилась – на 29 % ($t = 2,29 > t_{05} = 2,78$).

При сравнении биохимических показателей *D. salina* до и после обезвоживания, регистрировали статистически значимые изменения пигментного комплекса (рис. 1. Б). Содержание ХЛ *a* снизилось на 43 % ($t = 14,15 > t_{05} = 2,78$), ХЛ *b* – на 70 % ($t = 8,74 > t_{05} = 2,78$), КР – на 64 % ($t = 28,44 > t_{05} = 2,78$). Статистически значимо уменьшилось количество свободных нуклеотидов – на 53 % ($t = 9,44 > t_{05} = 2,78$). Изменение содержания РНК, ДНК, суммарных липидов и белков было статистически незначимо.

У *S. platensis* с повышением температуры дегидратации, от 30 до 60°C отмечено статистически значимые изменения содержания пигментов (рис. 1. В).

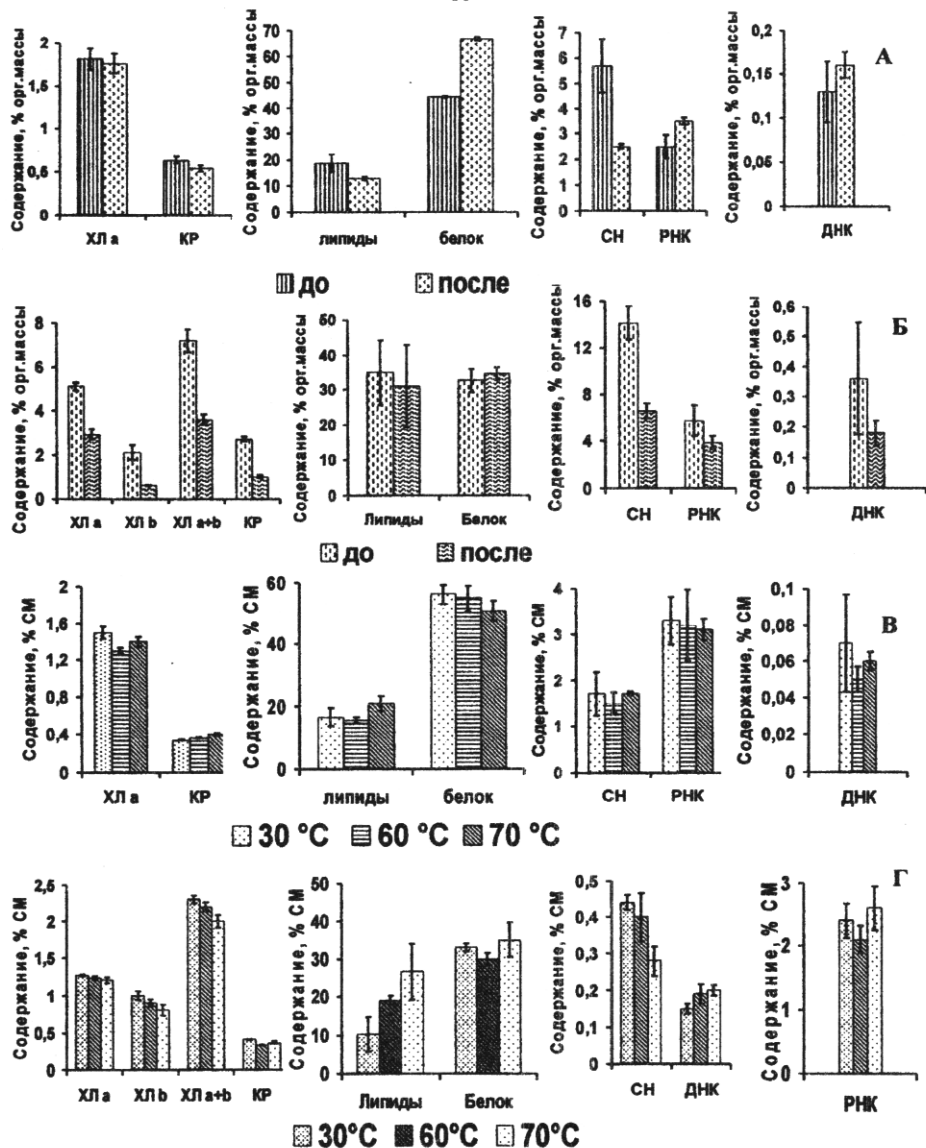


Рис. 1. Динамика компонентов биохимического состава *Spirulina platensis* (А, В), *Dunaliella salina* (Б, Г) до и после дегидратации и в зависимости от температуры обезвоживания.

У *D. salina* с увеличением температуры обезвоживания от 30 до 70°C, содержания компонентов пигментного комплекса снижалось. У этого вида, в этом же диапазоне выявлено значимое уменьшение содержания свободных нуклеотидов, повышение ДНК и липидов (рис. 1. Г).

Таким образом, как у про-, так и эукариотических водорослей при переводе их в состояние ангидробиоза, зарегистрировано снижение содержания пигментного комплекса, СН и липидов. При этом если у *S. platensis* изменения касались только пигментного комплекса, то у *D. salina* – пигментного, нуклеотидного и липидного комплексов.

РЕАКТИВАЦИЯ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ ИЗ АНГИДРОБИОЗА

Выбор условий регидратации. Восстановление жизнедеятельности клеток микроводорослей из ангидробиоза зависит от способа обезвоживания, условий хранения, а также от успешной регидратации. С целью выявления оптимальных условий регидратации (освещённость, увлажнитель) был проведён ряд экспериментов. Для выбора оптимального увлажнителя, регидратацию клеток проводили растворами комнатной температуры (20°C) и подогретыми до 30°C: 1) хлоридом натрия 0,25 М, 2) средой Zarouk, разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:1, 3) не разбавленной средой Zarouk. К навескам культуры *S. platensis*, массой 0,02 г, обезвоженным при температуре 30°C, добавляли по 0,5 мл выше перечисленных растворов (рис. 2. А). Регидратацию водорослей проводили двумя способами: а) после увлажнения перечисленными растворами, культуру выдерживали 24 ч при освещенности 2 кЛк., б) культуру помещали на 2 ч в темноту, а затем переносили на люминостат (освещённость 2 кЛк) (рис. 2. Б).

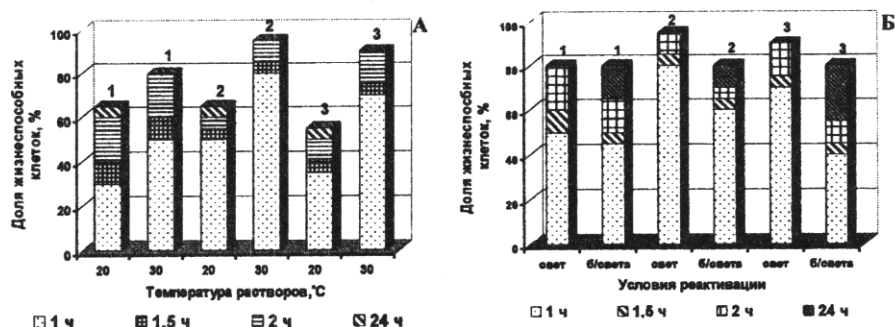


Рис.2. Влияние температуры растворов, используемых для регидратации (А) и условий реактивации (Б) на жизнеспособность *Spirulina platensis* (1 – хлорид натрия; 2 – среда Zarouk разбавленная 1:1; 3 – среда Zarouk).

В обоих экспериментах через 2 ч после начала регидратации к образцам, увлажненным первым и вторым растворами, добавляли 3–5 мл среды Zarouk, разбавленную дистиллированной водой (1:1). При увлажнении не разбавленной средой Zarouk, добавляли 3–5 мл того же раствора.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что реактивация *S. platensis* проходила более эффективно на свету, при увлажнении обезвоженных клеток разбавленной средой Zarouk (1: 1), при температуре растворов 30°C.

Зависимость жизнеспособности клеток микроводорослей от температуры их обезвоживания. Анализ полученных данных показал, что количество жизнеспособных клеток зависит от температуры дегидратации культуры (рис. 3). У *S. platensis* в первые часы реактивации наиболее высокая доля жизнеспособных клеток (90–95 %) была выявлена в культурах, обезвоженных при температуре от 20 до 60°C. Отсутствие жизнеспособных клеток и наличие лизированных наблюдали в культурах, обезвоженных при 70°C.

В культурах, обезвоженных при температурах 30 – 60°C, в течение 24 – 72 ч отмечали снижение количества жизнеспособных клеток до 80–75 %, начиная с 96 по 192 ч их количество оставалось стабильным и составляло 75–83 %. Доля живых клеток в культуре, дегидратированной при 20°C, оставалась неизменной 72 ч (90 %). Существенное снижение жизнеспособных клеток до 50 % было зафиксировано через

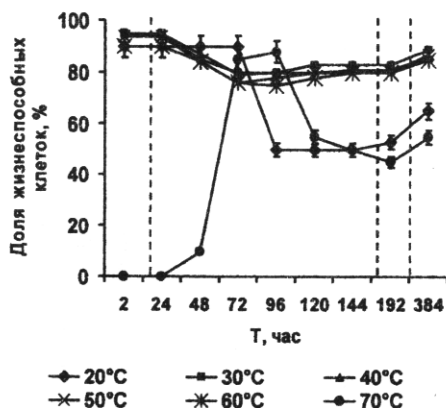


Рис. 3. Влияние температуры обезвоживания на жизнеспособность клеток *Spirulina platensis*

96 ч от начала реактивации, которое затем оставалось без изменений до 192 ч. У культуры *S. platensis*, высушенной при температуре 70°C, через 48 ч от начала реактивации доля жизнеспособных клеток составила 10 %, а через 72 ч наблюдали увеличение доли жизнеспособных клеток до 85 %. Однако, после 96 ч их количество вновь снижалось и продолжало убывать до 192 ч, после чего стабилизировалось (рис.3). Во всех исследуемых образцах через 384 ч реактивации отмечали увеличение числа жизнеспособных клеток.

Анализ полученных данных показал, что согласно классификации клеток по жизнеспособности, разработанной М. Н. Мейсель (1961), в реактивированных культурах присутствуют клетки 5-ти

типов (табл. 1). В культурах *S. platensis*, обезвоженных при 20–60°C, разделение на 1-й и 2-й тип клеток следует считать условным из-за трудности их дифференциации. Сильно повреждённые, медленно восстанавливающиеся клетки были отмечены только в культуре, обезвоженной при 70°C, на репарацию повреждений им потребовалось 8 дней. Общая потеря клеток во время реактивации в культуре, дегидрированной при температуре 20°C, составила 50 %, при 30–60°C – 20–25 %, при 70°C – 55 %.

Таблица 1

**Классификация клеток *Spirulina platensis* по жизнеспособности
при разных значениях температуры дегидратации**

№ п/ п	Типы жизнеспособности клеток (Мейсель, 1961 г.)	Доля реактивированных клеток, %					
		Температура дегидратации, °C					
		20	30	40	50	60	70
1	Полноценные, неповреждённые;						
2	Слегка повреждённые, быстро восстанавливающие свои функции,	50	80	80	78	75	-
3	Сильно повреждённые, медленно восстанавливающиеся	-	-	-	-	-	45
4	Необратимо повреждённые, продолжающие осуществлять нарушенный обмен веществ	40	15	15	16	15	40
5	Мёртвые	10	5	5	6	10	15

Таким образом, для вступления *S. platensis* в лог-фазу клеткам необходимо восстановить все повреждения, которые имели место при дегидратации. Дегидратация при температуре 20 и 70°C сопровождается повреждением большого количества клеток. Оптимальная температура дегидратации *S. platensis* находится в диапазоне от 30 до 60°C.

Морфометрические изменения клеток микроводорослей при реактивации. У *S. platensis* через 30 мин регидратации, независимо от способа обезвоживания, ширина клеток восстанавливалась на 88–91 % ($t = 2,79 > t_{05} = 2,02$, $t = 4,49 > t_{05} = 2,02$) и не изменялась в течение 24 ч. Длина клеток через 30 мин после увлажнения превышала таковую контрольных клеток. У клеток, обезвоженных при 30°C, она увеличивалась на 18 % ($t = 2,38 > t_{05} = 2,00$), при 60°C – на 11 % ($t = 0,99 < t_{05} = 2,02$), в эксикаторе с силикагелем – на 5 % ($t = 0,66 < t_{05} = 2,02$). Клетки приобретали свою нативную форму через сутки и их длина соответствовала 88 % контрольного образца у клеток, дегидрированных при 30°C, 85 % – при 60°C, 92 % – на силикагеле. Толщина клеток возрастала вдвое, независимо от условий дегидратации. После 24 ч реактивации наблюдали уменьшение длины трихом в 3–5 раз при всех способах

обезвоживания культур. Объем сухих трихомов составлял половину их объема до дегидратации. Спустя 30 минут регидратации он восстанавливался, однако через 24 ч сокращался в среднем на 30 %, что связано с уменьшением длины трихомов в процессе реактивации.

У *D. salina* ширина клеток, обезвоженных при 60°C, через 2 ч после увлажнения восстановилась на 76 % ($t = 8,37 > t_{05} = 1,98$), а у клеток, дегидратированных в эксикаторе с силикагелем – на 73 % ($t = 6,37 > t_{05} = 2,00$), при этом длина составляла 88 % и 95 % ($t = 3,85 > t_{05} = 1,98$, $t = 1,21 < t_{05} = 2,00$) их прежнего размера соответственно. У клеток, дегидрированных при 30°C и 45°C, восстановление размеров происходило значительно быстрее. Так, через 30 мин ширина клеток составляла 95 % и 87 %, а длина – 96 % и 85 % контрольного образца. Кроме того в культуре, дегидратированной при 30°C, через 30 мин после увлажнения, наблюдали восстановление клеток, среди которых преобладали шаровидные формы, тогда как у клеток, обезвоженных при температуре выше 30°C, во время регидратации происходило незначительное восстановление формы. У этих клеток объем и площадь поверхности не достигали первоначальных показателей.

У *S. elongatus* клетки приобретали исходные параметры в течение 30 мин после увлажнения. Скорость их восстановления не зависела от температуры дегидратации и была одинакова во всех экспериментах.

У микроводоросли *P. cruentum* не наблюдали восстановления диаметра, объема и площади поверхности клеток в течение 24 ч реактивации. Единичные клетки этого вида приобретали первоначальные размеры лишь через 10 дней.

Морфометрические характеристики *Ph. tricorutum* (ширина, длина, объем и площадь поверхности клеток) в период 24 ч реактивации также оставались без изменений. Через 1 месяц в реактивированной культуре отмечено увеличение размеров клеток и наличие деления.

Следовательно, у красных *P. cruentum* и диатомовых *Ph. tricorutum* микроводорослей, в процессе обезвоживания происходят стойкие изменения параметров клеток, для восстановления которых требуется продолжительный период.

Динамика реактивации микроводорослей из состояния ангидробии. Изложенные в предыдущих разделах разработанные способы дегидратации, регидратации и реактивации были апробированы на двух видах водорослей класса Суанорфусеае и трех видах классов Chlorophyceae, Rhodophyceae и Bacillariophyceae. Процессы, происходящие при реактивации, были прослежены в динамике, начиная с момента увлажнения и до начала деления клеток.

Реактивации *S. platensis* начиналась с относительно быстрого обводнения высушенных клеток и восстановления их морфометрических характеристик. Дифференциальное витальное окрашивание показало, что клетки морфологически соответствующие живым и способные к дальнейшему развитию, характеризуются диффузным синим окрашиванием цитоплазмы. Выявлено, что в процессе обезвоживания клеток изменяются физико-химические свойства цитоплазмы, в результате чего в ней происходит сорбирование красителя и его диффузное распределение, что является качественной реакцией, указывающей на состояние паранекроза. Через 1–2 ч от начала реактивации некоторые трихомы распадались на отдельные клетки. Через 24 ч при помощи фазово-контрастной микроскопии обнаруживали невосстановленные клетки. При этом в самих трихомах наблюдали чередование живых и повреждённых клеток. Погибшая часть клеток не окрашивалась. Через 72 ч повреждённые участки трихомов постепенно подвергались автолизу, а через 96 ч в культуре преобладали короткие трихомы, размеры которых варьировали от 20 до 60 мк. Они были жизнеспособны, имели сформировавшиеся концевые клетки. У обезвоженной *S. platensis* время лаг-фазы (периода от начала реактивации до первого деления) удлинялось до 2-х недель, в то время как в контроле продолжительность аналогичной фазы составила 24 ч, что свидетельствует о стойких физиолого-биохимических изменениях в клетках. Стадия экспоненциального роста *S. platensis* наступала через 672 ч (4 недели).

В процессе регидратации *D. salina* были отмечены сжавшиеся, деформированные клетки с повреждёнными оболочками. Восстановленные клетки были выявлены в культурах, обезвоженных на покровных стёклах с культуральной средой и среди клеток, осаждённых с перекристаллизованной солью питательной среды. У этого вида, дегидратированного при 30°C, через 30 минут после обводнения было обнаружено 10 % живых подвижных клеток от их общего количества. В пробах, обезвоженных при 60°C, через 24 ч реактивации количество жизнеспособных клеток составило около 1%. При реактивации водорослей, обезвоженных после центрифугирования при температуре 30, 60 и 70°C, как промытых, так и не промытых от культуральной среды, жизнеспособные нецистированные клетки обнаружены не были. Во всех образцах присутствовали цистированные клетки.

Восстановление исходных размеров *S. elongatus* было зарегистрировано через 30 мин после реактивации. Через 24 ч после начала реактивации микроводоросли переходили в стадию экспоненциального роста. При окрашивании клеток метиленовым синим, наблюдали явление паранекроза с последующим выходом из этого состояния. У культур, сохраняемых в обезвоженном состоянии в течение от 6

месяцев до 3 лет, регистрировали быстрое восстановление жизнеспособности клеток, не зависимо от температуры и времени дегидратации. Регидратация *P. cruentum* сопровождалась выделением в реактивационную среду пигмента фикоэритрина, что очевидно, связано с разрушением мембран и потерей клеточного вещества при реактивации. В течение 24 ч клетки не восстанавливали свои первоначальные морфометрические характеристики, их восстановление было зарегистрировано у единичных клеток через 10 дней от начала реактивации. Через 25 дней клетки переходили к делению. Восстановление *Ph. tricorutum* продолжалось в течение месяца, после чего клетки переходили к делению.

Таким образом, репарация клеток микроводорослей *Spirulina platensis* и *Synechococcus elongatus* представителей класса Cyanophyceae после обезвоживания происходит в короткие сроки по сравнению с другими видами микроводорослей и сопровождается переходом клеток к делению.

Ростовые и биохимические характеристики реактивированных культур. Кривые роста реактивированных культур *S. platensis*, *D. salina* аналогичны и не зависят от сроков пребывания их в состоянии ангидробии (рис.4). Ростовые характеристики реактивированных водорослей практически идентичны контролю (табл.2).

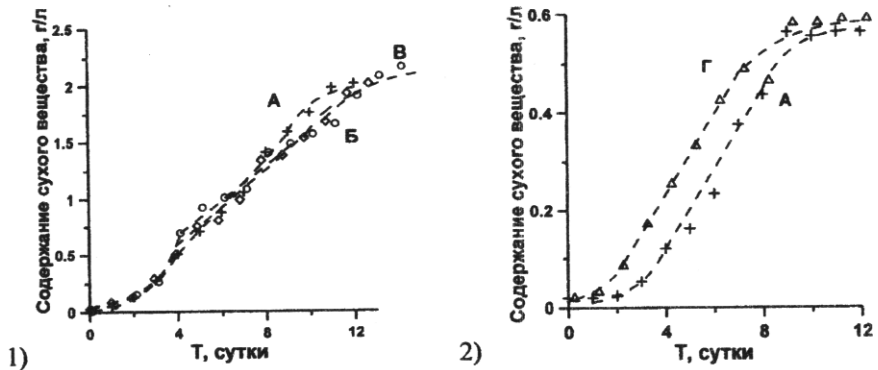


Рис. 4. Динамика биомассы накопительных культур *Spirulina platensis* (1) и *Dunaliella salina* (2) после реактивации. А – контрольная культура, Б – культура, пребывала в состоянии ангидробии 3 г, В – культура, пребывала в состоянии ангидробии 1 г, Г – культура, находившаяся в состоянии ангидробии 2 г, обезвожена с солью при температуре 30°C.

Биохимические показатели реактивированных культур *S. platensis* практически не отличались от таковых контрольной и не зависели от сроков

пребывания в обезвоженном состоянии за исключением содержания липидов, которое было ниже на 35 % в культуре пребывавшей в состоянии ангидробиоза один год. Отмечено, также снижения содержания белков на 12 % ($t = 7,43 > t_{05} = 3,18$) и повышением ДНК на 60 % в культуре реактивированной после 3-х летнего хранения в состоянии ангидробиоза.

Таблица 2

**Ростовые характеристики реактивированных микроводорослей
в различных фазах развития периодической культуры**

Фазы роста	Показатели	Ростовые характеристики		
		контроль	Культуры находились в состоянии ангидробиоза	
			3 г	1 г
<i>Spirulina platensis</i>				
Логарифмическая	μ_m	0,69	0,64	0,65
	g	1,0	1,08	1,06
Линейная	B	$0,50 + P_m(t-4)$	$0,46 + P_m(t-4)$	$0,57 + P_m(t-4)$
	P_m	0,21	0,13	0,12
Замедления	μ_r	0,82	0,68	0,49
	B_m	2,02	1,61	1,75
<i>Dunaliella salina</i>				
		контроль	2 г	
Логарифмическая	μ_m	0,81	0,8	
	g	0,85	0,86	
Линейная	B	$0,12 + P_m(t-4)$	$0,09 + P_m(t-4)$	
	P_m	0,08	0,08	
Замедления	μ_r	0,9	0,51	
	B_m	0,57	0,6	

Условные обозначения: μ_m – максимальная удельная скорость роста на логарифмической стадии роста (сут⁻¹), g – время удвоения биомассы на логарифмической стадии роста (сут), B – динамика плотности (г СМ/л-сут), P_m – средняя продуктивность на линейной фазе роста (г СМ/л-сут), μ_r – удельная скорость дыхания на стадии замедления роста (сут⁻¹), B_m – максимальное значение биомассы в конце стадии замедления роста (г СМ/л).

Институт биологии
морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ _____

ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В СОСТОЯНИИ АНГИДРОБИОЗА

Влияние длительности хранения на жизнеспособность культур в состоянии ангидробิโอ́за. Для оценки культур микроводорослей в состоянии ангидробิโอ́за проводили их реактивацию. У *S. platensis*, сохраняемой в обезвоженном состоянии в течение от 0,5 до 1 года, доля жизнеспособных клеток, через 2 ч от начала регидратации, составляла 93–94 %. С увеличением сроков хранения образцов до 6 лет, их количество снизилось до 76 % общего числа клеток.

Выявлена связь остаточной влажности клеток *S. platensis* с их жизнеспособностью. Так остаточная влажность в пределах 9–11 % способствует сохранению их жизнеспособности, тогда как её повышение до 12 % является критическим для выживания клеток в высушенном состоянии.

Количество жизнеспособных клеток *D. salina* зависит от времени пребывания их в состоянии ангидробิโอ́за. После 24 ч хранения обезвоженных водорослей без промывания культуры от питательной среды, доля живых клеток составила 2 %, через 48 ч – 0,73 % и через 144 ч – 0,03 % общего числа проанализированных клеток. При более длительном хранении жизнеспособные нецистированные клетки не выявлены. Во всех образцах, независимо от времени их пребывания в состоянии ангидробิโอ́за, были обнаружены цистированные клетки 0,7–2 % общего числа проанализированных клеток. В промытой от солей и обезвоженной культуре *D. salina*, независимо от длительности её хранения, цистированные клетки составляли 0,7 % общего числа клеток. Таким образом, хранение водорослей в воздушно-сухом состоянии в течение 7 суток приводило к гибели нецистированных клеток, а на количество цистированных клеток не влияли сроки хранения, температура обезвоживания, длительность процесса дегидратации и остаточная влажность культуры, что связано с видоспецифичностью вида.

Доля жизнеспособных клеток *S. elongatus* во всех обезвоженных пробах была высокой не зависимо от времени пребывания в состоянии ангидробิโอ́за. После увлажнения в течение 30 мин клетки восстанавливали свои первоначальные размеры; через сутки начинали делиться не зависимо от температуры (30–70°C), времени обезвоживания (4–36 ч), длительности хранения (0,6–3 год) и остаточной влажности (8–11 %) в высушенных культурах.

Через 4 месяца после перевода в состояние ангидробิโอ́за доля жизнеспособных клеток *P. cruentum* составила 6–8 % общего числа клеток, при их остаточной влажности 12,5 %. Вклад живых клеток, обезвоженных в тех же условиях, но до остаточной влажности 27,9 %, при хранении в течение 2-х месяцев находился в пределах 4 %, до остаточной влажности 11 % при сроке хранения

1 месяц – 10 % общего количества клеток. В культурах, сохраняемых в течение года при остаточной влажности 10,5–12,45 %, доля жизнеспособных клеток составляла всего 1 %.

Критерием жизнеспособности *Ph. tricorutum* был рост клеток на жидких питательных средах. Через 1 месяц от начала реактивации отмечали деление клеток. Наибольшее количество молодых клеток обнаружено в культурах с остаточной влажностью 14 % сохраняемых в течение 24 и 36 месяцев, меньше в культурах обезвоженных до остаточной влажности 11,6 и 12,1 %, также пребывающих в состоянии ангидробиоза 24 и 36 месяцев соответственно. У *Ph. tricorutum* с остаточной влажностью 7,7 % после реактивации молодых клеток не выявлено. Следовательно, для сохранения *Ph. tricorutum* в жизнеспособном состоянии необходимо, что бы остаточная влажность обезвоженных культур находилась в пределах 11,6–14 %.

Динамика содержания биохимических веществ в клетках микроводорослей в процессе их хранения. Анализ биохимических показателей выявил, что у *S. platensis* после года хранения в обезвоженном состоянии происходило снижение концентрации ХЛ *a* на 7–12 % по сравнению с данными при закладке образцов на сохранение, в то время как содержание каротиноидов уменьшалось незначительно. Доля свободных нуклеотидов в клетках за этот же период возросла в 4 раза, а ДНК снизилась в 9, 27 и 26 раз при 30°C, 60 и 70°C соответственно. Доля РНК в образцах, обезвоженных при 30, 60, 70°C понизилась на 20, 16, и 9 %. Отношение РНК/ДНК при длительном хранении *S. platensis* повысилось в 10 (обезвоживание при 30°C) и в 30 раз (при 60-70°C). Резкое возрастание концентрации свободных нуклеотидов у *S. platensis* произошло, возможно, из-за деструкции ДНК и РНК.

Отмечено, что у *D. salina* во время хранения в состоянии ангидробиоза в течение одного года происходила деструкция пигментного комплекса: содержание ХЛ *a* снизилось на 39 %, ХЛ *b* – на 72 %, а КР – на 87 % по сравнению с результатами биохимического анализа перед закладкой на хранение, что возможно, связано с отмиранием клеток в состоянии ангидробиоза. В обезвоженной культуре *D. salina*, через год после обезвоживания, нецестированные жизнеспособные клетки отсутствовали. Обнаружено, что деструкции подвергалась только ДНК, её доля снижалась на 58 %.

В наших экспериментах максимальное снижение содержания РНК составляло 20 %. Известно, что для сохранения жизнеспособности клеток количество РНК должно быть не менее 60 % по сравнению с первоначальным (Бекер и др., 1990). Данный факт свидетельствует о сохранении клетками их жизнеспособности.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что микроводоросли водной среды обитания могут сохраняться в обезвоженном состоянии длительное время (в течение нескольких лет). Разработаны методы их перевода в состояние ангидробиоза, длительного хранения и реактивации. Методы апробированы на 5 видах микроводорослей разных систематических групп.
2. В состояние ангидробиоза переведены 2 вида прокариотических (*Spirulina platensis*, *Synechococcus elongatus*) и 3 вида эукариотических (*Dunaliella salina*, *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*) микроводорослей. Экспериментальным путём определено, что температура 30–60°C является оптимальной для перевода в состояние ангидробиоза изучаемых видов.
3. Дегидратация культур микроводорослей вызывает морфометрические изменения клеток по сравнению с контролем, которые носят видоспецифичный характер: для *Spirulina platensis* характерно увеличение длины (при 60°C на 22%) и уменьшение ширины клеток (на 25–31%); для *Phaeodactylum tricornutum* выявлено снижение их ширины (на 5 %) и длины (на 11 %); для *Synechococcus elongatus* отмечено сокращение ширины (на 20 %); для *Porphyridium cruentum* – уменьшение их диаметра (на 25 %); тогда как клетки *Dunaliella salina* приобретают шаровидную форму.
4. Перевод про- и эукариотических микроводорослей в состояние ангидробиоза сопровождается статистически значимым снижением содержания пигментов, свободных нуклеотидов и липидов. Изменение нуклеотидного и пигментного комплексов может служить критерием оценки жизнеспособности водорослей в ангидробиозе.
5. Установлено, что реактивация микроводорослей из состояния ангидробиоза эффективна при следующих условиях: использование разбавленных сред в соотношении 1 : 1, температура растворов 25–30°C и освещённость около 2 кЛк.
6. Восстановление морфометрических показателей реактивируемых клеток и способности их к делению у прокариотических водорослей происходит быстрее, чем у эукариотических. Размеры клеток прокариотических микроводорослей восстанавливаются в течение 30 мин – 24 часов, а эукариотических через 10–30 дней. Процесс деления клеток после реактивации начинается у прокариотов через 1 день (*Synechococcus elongatus*) и 14 дней у (*Spirulina platensis*), у эукариотов – 20–30 дней. Ростовые и биохимические характеристики реактивируемых водорослей, как прокариотических, так и эукариотических не зависят от сроков пребывания их в состоянии ангидробиоза.

7. Определены оптимальные условия хранения ангидробиозных культур, позволяющие сохранить высокую долю жизнеспособных клеток в течение 0,5–6 лет (76 % клеток *Spirulina platensis* в течение 6 лет, 100 % клеток *Synechococcus elongatus* и цист *Dunaliella salina* в течение 3-х лет). Требуемые условия: герметичность упаковки, без доступа света, температура окружающей среды 15–20°C.
8. Выявлена тенденция к снижению доли жизнеспособных клеток микроводорослей при хранении их в состоянии ангидробиоза, которая наиболее интенсивно выражена в период от 1 до 4 лет, пребывания культур в состоянии ангидробиоза, после чего доля отмирающих клеток незначительна. Количество клеток, сохраняющих жизнеспособность, является видоспецифичным признаком.
9. Отмечена зависимость жизнеспособности микроводорослей в состоянии ангидробиоза от остаточной влажности, оптимум которой составляет: 9–11 % у *Spirulina platensis*, 8–11 % у *Synechococcus elongatus*, 12–14 % у *Phaeodactylum tricornutum*.
10. Разработанный метод хранения микроводорослей является экономически выгодным и позволяет рекомендовать его для широкого использования в биологических областях науки и производства.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Харчук И. А. Способ реактивации цианобактерий *Spirulina platensis* (Nordst) из ангидробиоза / И. А. Харчук // Экология моря. – 2003. – Вып. 64. – С. 86–89.
2. Харчук И. А. Влияние температуры дегидратации на нуклеиновые кислоты *Dunaliella salina* / И. А. Харчук // Экология моря. – 2005. – Вып. 69. – С. 64–67.
3. Харчук И.А. Анабиоз: закономерности и сопровождающие его процессы / И. А. Харчук // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 62–78.
4. Харчук И. А. Динамика фракционного состава липидов в клетках *Spirulina platensis* (Nordst) в зависимости от температуры дегидратации / И. А. Харчук, Ю. П. Копытов // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 79–83.
5. Брянцева Ю. В. Характеристика цианобактерий *Spirulina (Arthrospira) platensis* / Ю. В. Брянцева, И. В. Дробещкая, И. А. Харчук // Экология моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 24–30.
6. Харчук И. А. Влияние длительности хранения на жизнеспособность клеток *Spirulina platensis* Nords в состоянии ангидробиоза / И. А. Харчук // Экология моря. – 2007. – Вып. 74. – С. 80–83.

7. Харчук И. А. Влияние температурных режимов обезвоживания на нуклеиновые кислоты *Spirulina platensis* / И. А. Харчук, И. Н. Гудвилович // 36. наук. праць «Актуальні проблеми ботаніки та екології» / гол. ред. Я. Н. Дидух. – Київ : Фітосоціоцентр, 2005. – Вип. 1. – С. 230–234.
8. Харчук И. А. Влияние дегидратации на морфометрические и биохимические характеристики цианобактерий *Spirulina platensis* (Nordst) Geitler / И. А. Харчук, Ю. В. Брянцева // 36. наук. праць «Актуальні проблеми ботаніки та екології» / гол. ред. Я. Н. Дидух. – Київ : Фітосоціоцентр, 2008. – Вип. 2 – С. 21–24.
9. Харчук И. А. Изменчивость морфометрических характеристик клеток морских микроводорослей в результате дегидратации - регидратации / И. А. Харчук, Ю. В. Брянцева // Труды ЮгНИРО «Основные результаты комплексных исследований в Азово-Черноморском бассейне и мировом океане» (Юбилейный выпуск) / гл. ред. Б. Н. Панов. – Керчь : Изд-во ЮгНИРО, 2008. – Том. 46 – С. 87–92.
10. Харчук И. А. Изменения, происходящие в процессе реактивации цианобактерий *Spirulina platensis* / И. А. Харчук // XXIV конф. молодых учёных Мурманского морского биологического института, май 2006 г. : материалы докл. – Мурманск : Мзд. ММБИ КНЦ РАН, 2006. – С. 139–141.
11. Харчук И. А. Реактивация микроводорослей из состояния ангидробิโอ́за / И. А. Харчук, Р. П. Тренкеншу, А. В. Алисеевич // Биоразнообразие. Экология. Эволюция. Адаптация. : науч. конф. студентов, аспирантов и молодых учёных, посвящ. 180 – летию со дня рождения Л. С. Ценковского, 28 марта – 1 апреля 2003 г. : материалы докл. Одесса, 2003. – С. 177.
12. Харчук И. А. Разработка метода реактивации микроводорослей из ангидробิโอ́за / И. А. Харчук // Понт Эвксинский III: конф. молодых учёных по проблемам Чёрного и Азовского морей, 27–30 мая 2003 г. : тезисы докл. – Севастополь, 2003. – С. 77–78.
13. Харчук И. А. Влияние температурных режимов обезвоживания на биохимический состав *Spirulina platensis* (Arthrospira) / И. А. Харчук, И. Н. Гудвилович // Актуальні проблеми ботаніки та екології : конф. молодих учених-ботаніків, 7–10 верес. 2004 г. : матеріали докл. – Канів, 2004. – Вип. 9. – С. 192–193.
14. Харчук И. А. Динамика нуклеиновых кислот *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. в зависимости от режимов дегидратации / И. А. Харчук // Актуальные проблемы современной альгологии: материалы III междунар. конф., 20–23 апр. 2005 г. : материалы докл. – Харьков, 2005. – С. 171–172.

15. Харчук И. А. Динамика нуклеиновых кислот ангидробиозных культур *Spirulina platensis* / И. А. Харчук // Понт Эвксинский IV: IV Всеукр.науч. – практ. конф. молодых учёных по проблемам Черного и Азовского морей, 24–27 мая 2005 г. : тезисы докл. – Севастополь, 2005. – С. 155.
16. Харчук И. А. Выбор способа дегидратации и реактивации микроводорослей / И. А. Харчук // Актуальні проблеми дослідження та збереження фіторізноманіття: конф. молодих учених – ботаніків, 6–9 верес. 2005 р. Нац. Дендролог. парк „Софіївка” НАНУ, Умань: матеріали докл. – Київ, 2005. – С. 171–172.
17. Харчук И. А. Реактивация *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler и сопровождающие её процессы / И. А. Харчук, Р. П. Тренкеншу // Проблемы биологической океанографии XXI века : междунар. науч. конф., посвящ. 135-летию ИнБЮМ, 19–21 сентября 2006 г. : тезисы докл. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2006. – С. 172.
18. Харчук И. А. Ангидробиоз, как способ сохранения микроводорослей / И. А. Харчук / Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології : міжнародної конф. молодих учених – ботаніків 27–30 вересня, 2006 р. : матеріали докл. – Київ : Фітосоціоцентр, 2006. – С. 173–174.
19. Kharchuk I. A. Influence of temperature dehydration on viability / I. A. Kharchuk // “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution.” : III international young scientists conference, dedicated to 100 anniversary from birth of famous Ukrainian lichenologist Maria Makarevych, 15–18 may, 2007 г. : матеріали докл. – Одеса : Печатный дом, 2007. – Р. 32.
20. Харчук И. А. Ростовые и биохимические характеристики культур микроводорослей выведенных из состояния ангидробиоза / И. А. Харчук // Понт Эвксинский V: V Междунар. науч. – практ. конф. молодых учёных по проблемам водных экосистем 24–27 сентября 2007 г. : тезисы докл. – Севастополь, 2007. – С. 103–104.

Харчук И. А. Ангидробиоз микроводорослей как способ сохранения их жизнеспособности – Рукопись.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.17 – гидробиология. – Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, 2008.

Диссертация посвящена разработке метода длительного хранения микроводорослей без применения питательных сред, который позволяет сохранять их жизнеспособность в обезвоженном состоянии в течение длительного времени. Метод включает перевод клеток в состояние ангидробиоза, их хранение и

реактивацию, т. е. переводение в активную культуру. Исследованы морфометрические параметры клеток при обезвоживании и последующей регидратации микроводорослей разных систематических групп. Показано, что изменения носят видоспецифичный характер. Проведен анализ биохимического состава микроводорослей до и после, в зависимости от температуры обезвоживания. Установлено, что оптимальная температура дегидратации для исследованных микроводорослей находится в диапазоне 30–60°C, дегидратация при температуре выше 60°C приводит к необратимым изменениям в клетках. Разработан метод реактивации микроводорослей из ангидробриоза, оптимальными условиями, которого являются: использование растворов сред с температурой 25–30°C, разбавленных в соотношении 1:1, освещённость 2 кЛк. Показано, что прокариотические водоросли по сравнению с эукариотическими быстрее восстанавливают первоначальные размеры (прокариоты через 30 мин – 24 ч, а эукариоты через 10 – 30 дней) и переходят к делению клеток (*Synechococcus elongatus* – через 1 день, *Spirulina platensis* – 14 дней, эукариоты – 20–30 дней). Ростовые и биохимические характеристики реактивированных микроводорослей не зависят от сроков пребывания культур в состоянии ангидробриоза. Экспериментально показано, что хранение обезвоженных культур в герметичной упаковке при 15–20°C в темноте, обеспечивает жизнеспособность 76 % клеток *Spirulina platensis* в течение 6 лет, и до 100 % клеток *Synechococcus elongatus* и цист *Dunaliella salina* – в течение 3-х лет. Для исследованного периода времени выявлена тенденция к снижению доли жизнеспособных клеток с увеличением сроков хранения. Количество клеток сохраняющих жизнеспособность, является видоспецифичным признаком. Жизнеспособность культур микроводорослей в состоянии ангидробриоза зависит от остаточной влажности, её оптимум составляет: у *Spirulina platensis* – 9–11 %, у *Synechococcus elongatus* – 8–11 %, у *Phaeodactylum tricornutum* – 12–14 %.

Ключевые слова: ангидробриоз, микроводоросли, дегидратация, реактивация, регидратация, жизнеспособность, морфометрические и биохимические характеристики.

Харчук І. А. Ангидробіоз мікрроводоростей як спосіб збереження їх життєздатності – Рукопис.

Дисертація на здобуття учёной ступеня кандидата біологічних наук за фахом 03.00.17 – гідробіологія. – Інститут біології південних морів ім. А.О. Ковалевського НАН України, Севастополь, 2008.

Дисертація присвячена розробці методу тривалого зберігання мікроводоростей без використання живильного середовища, який дозволяє зберігати їх життєздатність в зневодненому стані протягом довгого часу. Метод включає перевід клітин в стан ангідробіозу, їх зберігання і реактивацію, тобто переведення в активну культуру. Аналіз морфометричних і біохімічних характеристик мікроводоростей при переведенні в ангідробіоз і реактивації дозволив визначити умови де- і регідратації клітин. Оптимальна температура дегідратації для досліджених водоростей знаходиться в діапазоні 30–60°C, дегідратація при температурі вищій за 60°C приводить до незворотних змін в клітинах. Умови регідратації є: використання розбавлених розчинів середовищ (1:1), температура якої складає 25–30°C, освітленість близько 2 кЛк. Визначені умови що забезпечують збереження мікроводоростей в стані ангідробіозу. Показаний взаємозв'язок життєздатності і залишкової вологості культури. Вперше определён её оптимум: для *Spirulina platensis* – 9–11 %, для *Synechococcus elongatus* – 8–11 %, для *Phaeodactylum tricornutum* – 12–14 %.

Ключові слова: ангидробіоз, мікроводорості, дегідратація, реактивація, регідратація, життєздатність, морфометрические і біохімічні характеристики.

Kharchuk I. A. Anhydrobiosis as a way for preserving the vitality of microalgae. – Manuscript.

Dissertation for the Degree of Philosophy Doctor (03.00.17 – Hydrobiology). – The A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, 2007.

The dissertation proposes a method that permits to preserve microalgae for long time spans without using a nutritive medium – the dehydrated microalgae stay viable for long. The procedure entails anhydrobiosis, storage and reactivation, i.e., restoration of the cells to active culture. Analysis of the morphometric and biochemical characteristics under anhydrobiosis and reactivation has clarified the essential conditions of microalgal de- and rehydration. Under dehydration the optimum temperature range is from 30 to 60°C, higher temperature triggers irreversible changes in the cell. The rehydration requires solutions of media (1:1) with the temperatures from 25 to 30°C and the light of about 2 kLx. The reported investigation has elicited relationship between culture viability and residual moisture with the optimums specified for *Spirulina platensis*, *Synechococcus elongates* and *Phaeodactylum tricornutum* as 9–11, 8–11 and 12–14%, respectively.

Key words: anhydrobiosis, microalgae, dehydration, reactivation, rehydration, viability, morphometric and biochemical characteristics.