

CZU: 579.8

DOI: 10.46727/c.v1.18-19-03-2023.p192-199

METODE DE CONSERVARE ÎN MICROBIOLOGIE (Articol de sinteză)

CONSERVATION METHODS IN MICROBIOLOGY (Synthesis article)

*Olga Țurcan, cercetător științific, Universitatea Tehnică a Moldovei din Chișinău
Tamara Sîrbu, dr.șt.biologice, conf.univ., Universitatea Tehnică a Moldovei din Chișinău*

Olga Turcan, scientific researcher Technical University of Moldova in Chisinau

ORCID: 0000-0002-7103-5986, olga.turcan@imb.utm.md

Tamara Sirbu, Ph.D. in Biology, associate professor, Technical University of Moldova in Chisinau

ORCID: 0000-0001-7809-9870

Abstract. *A brief survey of the methods of preservation of microorganisms used in national and international live culture collections is presented. The important factors in the preparation stage of the microbial cultures selected for preservation and which affect the result of their storage are described. Ways to improve methods of long-term storage of microorganisms, which may be useful in practical work, are considered.*

Key-words: *microorganisms, preservation, lyophilization, cryopreservation, cryoprotectors.*

Biotehnologia bazată pe capacitățile funcționale ale microorganismelor este extrem de importantă pentru economia globală. Microorganismele (bacterii, inclusiv actinomicete, drojdii, micromicetele, microalgele și cianobacteriile) sunt furnizori excelenți de substanțe biologice active utilizate cu succes în diverse sectoare de producție majoră, inclusiv agricultură, medicină și farmaceutică, bioremediere, industria alimentară, producere de biocombustibili etc. [38].

Colecțiile de culturi se află în centrul eforturilor de conservare a diversității biologice. Scopul principal al acestora este de a depozita și a păstra materialul viabil (tulpini de microorganisme) identificat cu precizie, lipsit de microbi, pentru cercetare, oferind culturi și material genetic pur necesar pentru diverse aplicații biotehnologice, în calitate de material de predare, cercetare și alte scopuri, deoarece sarcina lor principală este de a colecta, conserva și a produce tulpini microbiene accesibile publicului. Unele colecții de cultură oferă și servicii microbiologice instituțiilor academice și de industrie, și efectuează studii legate de sistematică, contribuind astfel la îmbogățirea cunoștințelor și conducând la descoperirea de noi taxoni. Astfel Colecțiile de culturi joacă un rol semnificativ, nu numai în dezvoltarea industriilor bazate pe biotehnologie și în educație, ci și mai important, în conservarea tulpinilor de microorganisme care fac parte din patrimoniul unei țări [21, 38].

În prezent, se folosesc diverse metode pentru conservarea microorganismelor, dar toate metodele moderne de conservare și depozitare pe termen lung a culturilor de microorganisme se bazează pe transferul celulelor într-o stare anabiotică cu o stare parțială (depozitare pe medii cu un conținut minim de nutrienți, în vase sterile, sub un strat de ulei mineral, în apă distilată, la temperaturi scăzute etc.) sau completă (uscarea, liofilizare, crioconservare etc.) de încetare a metabolismului. Fiecare dintre metode are propriile avantaje și dezavantaje și poate avea un efect diferit nu numai asupra viabilității, ci și asupra păstrării proprietăților caracteristice și a trăsăturilor fiziologice, biochimice și genetice ale culturii. Alegerea celei mai eficiente metode de conservare a unui anumit organism ar trebui să se bazeze pe păstrarea viabilității culturii, a trăsăturilor morfologice, a caracteristicilor fiziologice, a activităților biochimice și a stabilității genetice, ținând cont de timpul maxim posibil de depozitare a culturilor, precum și a celor mai eficiente metode de conservare a unui

anumit organism, de simplitate și fiabilitatea implementării acestor metode de conservare și întreținere a cerințelor pentru o lungă durată de timp. Trebuie subliniat faptul că păstrarea viabilității culturii în timpul conservării prin unele metode poate să nu fie corelată cu păstrarea activității. Prin urmare, în unele cazuri, pentru păstrarea proprietăților unice ale organismului, este necesar să se efectueze lucrări de cercetare cu o tulpină individuală pentru a optimiza condițiile de conservare a acesteia [3, 16, 35]. Cele mai comune metode de păstrare a microorganismelor în colecții sunt:

1. Menținerea culturile prin transferul periodic pe medii lichide și/sau agarizate-fiind metoda tradițională de depozitare a microorganismelor realizată prin cultivarea periodică pe medii nutritive proaspete. Intervalul dintre reînsămânțări depinde de tipul de microorganismului, de mediul folosit și de condițiile externe. Unele microorganisme trebuie să fie reînsămânțate constant, altele după câteva săptămâni sau luni. La utilizarea acestei metode trebuie luate în considerare următoarele condiții: 1) un mediu nutritiv adecvat, 2) condițiile de cultivare (temperatura de depozitare, regimul de lumină), 3) periodicitatea necesară de cultivare și reînsămânțare. În general menținerea diferitor tulpini de microorganisme în colecții într-o stare viabilă necesită cheltuieli semnificative de resurse material, timp și necesită personal înalt calificat. De exemplu orice colecție algologică, inclusiv colecții recunoscute precum SAG, UTEX, CCAP se confruntă cu fenomene de moarte imprevizibilă a culturilor, contaminarea tulpinilor cu ciuperci, bacterii, protozoare și alte alge, cu probleme de erori de etichetă la reînsămânțarea tulpinilor. Necesitatea menținerii stabilității genetice a speciilor, precum și costurile ridicate și laboriositatea reînsămânțării successive a algelor, a condus la dezvoltarea unor metode de conservare pe termen lung, care au eficiențe diferite.

Colecțiile de cultură cresc atât în mediu lichid, cât și pe agar-agar [12, 13, 14]. Spre exemplu cultivarea continuă a microalgelor și a cianobacteriilor se realizează prin metoda microbiologică aseptică și constă în transferul inoculului (1-10% din cultura originală) din faza logaritmică târzie sau staționară a creșterii culturii într-un mediu nutritiv proaspăt, presterilizat. Prin această metodă, se fac subculturi periodice pe un mediu nutritiv proaspăt la intervale diferite, de obicei de la 2 săptămâni până la 6 luni, în funcție de rata de creștere a organismului și de condițiile de creștere. Temperaturile optime de creștere variază și pentru majoritatea cianobacteriilor și microalgelor și se află în intervalul 10-25 °C. Lumina artificială este furnizată de lămpi fluorescente albe, reci sau calde, fiind metoda standard de iluminare pentru culturile de cianobacterii și microalge fotoautotrofe și mixotrofe. Lumina folosită ar trebui să ofere cel mai adesea un ciclu de lumină/întuneric în intervalul 16h:8h și 12h:12h. Alternativ, lumina naturală poate fi folosită prin plasarea culturilor pe o fereastră orientată spre nord. Intensitatea luminoasă folosită la alge este de obicei de 50 $\mu\text{E m}^{-2}\text{c}^{-1}$. Cianobacteriile necesită o iluminare mai scăzută, iluminarea optimă fiind în regiunea de 25 $\mu\text{E m}^{-2}\text{c}^{-1}$ [14].

Una din metodele moderne de păstrare a microorganismelor este **liofilizarea** care este o metodă de păstrare a celulelor în stare uscată pentru perioadă îndelungată de timp fără acces la oxigen, umiditate și lumină, la temperaturi scăzute, de obicei la 4°C [24]. Liofilizarea nu asigură conservarea 100% a viabilității celulelor microorganismelor, și nu asigură întotdeauna cea mai înaltă calitate a unui produs uscat. S-a stabilit că procesul de liofilizare duce la selecția celor mai rezistente celule din cultură, care pot să nu aibă proprietățile dorite. Procesul de liofilizare poate fi afectat de factori negativi care acționează asupra structurilor celulare și anume:

1) Cristalele de gheață deteriorează mecanic membrana și structurile intracelulare. Ele reprezintă un pericol deosebit în timpul înghețului lent, când se formează cristale mai mari.

2) O parte din electronii dizolvați în fluidul celular nu sunt eliberați din celulă, care, pot denatura proteinele în timpul reactivării celulelor.

3) Într-un vid profund, moleculele de vapori de apă cu energie cinetică mare pot deteriora mecanic zone importante ale structurilor celulare. Efectul negativ al moleculelor de apă care trec prin stratul de biomasă sub vid a fost dovedit științific.

4) Un număr mare de date experimentale arată că procesul de liofilizare provoacă mutații în multe tipuri de microorganisme [2, 3, 22, 29, 35, 44].

Cu toate acestea, unii cercetători cred că liofilizarea asigură o stabilitate mai mare decât reînsămânțarea periodică pentru o gamă largă de microorganisme, iar celulele care supraviețuiesc procesului de liofilizare pot rămâne viabile mulți ani. S-a stabilit experimental că metoda de liofilizare este utilizată cu succes pentru a conserva microorganismele care se reproduc prin akinete (spori) precum cianobacteriile, micromicetele, actinomicete, bacterii [9, 12, 26, 31].

Un moment important în procesul de liofilizarea reprezintă utilizarea substanțelor care protejează celulele de efectele negative ale temperaturilor scăzute-crioprotectori. Crioprotectorii sunt substanțe chimice care aparțin unor clase diferite de compuși, dar au o capacitate comună de a reduce criodeteriorarea structurilor biologice. Liofilizarea bacteriilor este de obicei efectuată cu utilizarea mediilor de protecție care conțin zaharuri și compuși proteici deoarece celulele sunt suspendate în apă sau soluție salină nu supraviețuiesc liofilizării. Se știe că zaharurile pătrund în celule și cresc presiunea osmotică prevenind formarea a cristalelor de gheață și distrugerea celulelor în timpul înghețului. Compușii proteici din mediile de protecție nu pătrund în celule ci favorizează apropierea peretelui celular cu citoplasma moment important pentru conservarea celulelor în timpul decongelării. Pentru a reduce formarea cristalelor de gheață, fiolele trebuie să fie înghețate rapid. Culturile liofilizate trebuie păstrate la întuneric la 1–4°C, deoarece s-a observat moartea rapidă a celulelor la temperatura camerei și mai ales la 30°C [45, 46, 47].

În calitate de crioprotectori se utilizează laptele degresat, glucoză, zaharoză, glicerol, DMSO (dimetil sulfoxid) etc. Spre ex. în cazul algelor în cele mai multe cazuri, în calitate de crioprotectori se utilizează DMSO (dimetil sulfoxid) sau glicerol în concentrații de 5 sau 10% Pentru o serie de tulpini de *Chlorella* și *Euglena*, se poate folosi metanol [13, 19, 45]. Crioprotectorii care cresc viabilitatea celulelor la temperaturi criogenice, la temperaturi fiziologice după recultivare, se pot dovedi a fi toxici pentru celule, iar amploarea impactului lor negativ va depinde de temperatura și durata de expunere a celulelor cu un crioprotector, prin urmare, se crede că crioprotectorul trebuie îndepărtat din mediu și din celule imediat după dezghețare, prin spălări succesive și centrifugare [18, 34].

Suspendarea celulelor cu mediu de protecție înainte de liofilizare crește numărul de culturi supraviețuitoare. Într-un studiu realizat au fost liofilizate 106 tulpini de alge din filumul Chlorophyta și Chrysophyta, 39 dintre ele au fost reactivate cu succes. Liofilizarea a fost efectuată cu agenți de protecție (lapte degresat, zaharoză, ser de miel sau cal), rezultate pozitive s-au obținut folosind lapte degresat 20% și zaharoză 12% [9, 31, 40].

În Colecția Germană de Microorganisme și Culturi celulare (DSMZ), laptele degresat este folosit ca mediu de protecție pentru liofilizarea bacteriilor. Conform datelor din literatură, viabilitatea bacteriilor păstrate prin metoda variază de la 5 la 35 de ani [1]. Medii de protecție utilizate în DSMZ pentru liofilizarea drojdiilor conține ser de cal suplimentat cu 7,5% glucoză sau amestecul de 10% lapte degresat, 10% trehaloză și 10% sodiu glutamat. Drojdiile supraviețuiesc slab liofilizării; cca 1-30% din celule rămân viabile, însă cantitatea de celulelor rămasă este suficientă pentru întreținerea cultură. Drojdiile sunt mai tolerante la depozitarea în azot lichid decât la liofilizare. Însă metoda de depozitare a drojdiei în azot lichid are dezavantaje, cum ar fi riscul accidental de dezghețare

imposibilitatea de a expedia cultura; prin urmare, liofilizarea este considerată o metodă mai de încredere. În DSMZ, drojdiile liofilizate își pot păstra viabilitatea timp de 30 de ani fără modificări considerabile ale proprietăților lor [5, 6]. În curs de 50 de ani de depozitare, numărul de celule viabile de drojdie a scăzut treptat dar a rămas suficient pentru întreținere culturii pentru deceniile următoare. Bacteriile producătoare de polizaharide sunt cunoscute ca să fie slab liofilizate. Iată din ce cauză se poate explica că viabilitatea la *Azotobacter* care formează o capsulă polizaharidică, a fost de la $10^4 - 10^6$ și a scăzut la $10^3 - 10^5$ celule per fiolă după 50 de ani de păstrare. În timpul depozitării pe termen lung, în mediu de protecție care conține amestecul de 1% gelatină și 10% zaharoză a asigurat o mai bună viabilitate a culturilor față de mediile care conțin lapte degresat și lapte degresat cu glucoză, posibil pentru că este ridicat conținutul de zahăr și proteine. [1, 36]. Efectul pozitiv al mediului de protecție asupra viabilității celulelor în timpul liofilizării, cât și în timpul depozitării a culturilor liofilizate s-a observat și în cazul bacteriilor acidolactice. În experimentele cu *L. pentaaceti*, cele mai bune rezultate au fost obținute, totuși, cu mediu care conține lapte și glucoză și în principal datorită particularităților fiziologice ale bacteriilor acidolactice [23, 24]. Cu toate acestea, în toate cazurile, titrul celulelor viabile după 50 de ani stocarea a rămas la un nivel ridicat. Astfel, aceste cercetări dovedesc că este posibilă conservarea bacteriilor și drojdiilor liofilizate pentru 50 de ani; fiind cea mai lungă perioadă de păstrare decât cele raportate până recent (păstrarea bacteriilor -de la 5 la 35 de ani și a drojdiilor-30 de ani) [1, 2, 11]. Trebuie remarcat faptul că procesul de liofilizare necesită atât costuri de investiții inițiale, cât și abilități practice specifice din partea personalului în timp ce nu asigură viabilitatea 100% a celulelor de microorganisme conservate și nu oferă întotdeauna cea mai înaltă calitate a produsului uscat [1, 6, 16, 36].

Crioconservarea este considerată cea mai eficientă metodă de conservare pe termen lung a organismelor prin păstrarea microorganismelor la temperatură joasă. Metoda constă în transferul obiectelor biologice într-o stare de anabioză rece cu revenirea lor ulterioară la activitatea metabolică în condiții fiziologic optime de cultivare. În ceea ce privește temperatura de îngheț, toate metodele cunoscute în prezent de crioconservare pot fi împărțite în două tipuri principale: a) metode care implică păstrarea celulelor la o temperatură peste temperatura azotului lichid, b) metode de crioconservare care implică depozitarea celulelor la o temperatură a azotului lichid. Crioconservarea este utilizată pentru a menține probele de cultură viabile și stabile genetic [15, 34, 35]. Tehnicile de crioconservare dezvoltate pentru celulele de mamifere și bacterii au fost aplicate cu succes la plante și protozoare, dar au dat rezultate slabe atunci când sunt aplicate la microalge ceea ce poate fi explicat prin faptul că microalgele sunt caracterizate printr-o mare diversitate de specii din diferite habitate. Până în prezent, nu există o metodă universală de crioconservare a algelor care să asigure un nivel ridicat al viabilității acestora după dezghețare [15, 32, 44].

a) Depozitare la temperaturi scăzute. O scădere a temperaturii duce la o încetinire a tuturor reacțiilor biochimice care apar în organism, la un nivel mai jos, cu cât temperatura de depozitare este mai joasă. Cel mai favorabil interval de temperatură pentru depozitarea culturilor microbiene în frigider este de la -60°C până la -130°C , adică temperaturi semnificativ mai scăzute decât punctul eutectic al suspensiilor celulare (pentru majoritatea suspensiilor de microorganisme, punctul eutectic este în intervalul de la -5°C până la -15°C , dar pentru unele soluții acestea sunt sub -30°C) [35, 20]. Pentru conservarea cu succes a diferitelor tipuri de microorganisme prin depozitare la temperatură scăzută și metode de crioconservare, se utilizează uscarea preliminară a celulelor pe purtători deshidratați, ceea ce contribuie la înghețarea lor nedureroasă într-o stare de anabioză rece. Se știe că cu cât microorganismul este mai deshidratat, cu atât tolerează mai bine înghețarea și ciclurile repetate

de îngheț-dezghet. În plus, celulele de microorganisme imobilizate de obicei își păstrează viabilitatea și activitatea biochimică atunci când sunt expuse la factori extremi asociați cu conservarea, mult mai bine decât celulele microbiene libere [4].

b) Crioconservare într-un mod ultrarapid. Acest mod de conservare se realizează prin imersarea directă a fiolelor cu microorganisme și soluție crioprotectoare în azot lichid la o viteză de răcire de ~400 grade/min [12, 13, 14]. Pentru crioconservare se poate folosi o suspensie de celule sau spori de microorganisme, sau discuri de agar 5% cu cultură, atât în soluție crioprotectoare cât și fără aceasta. Substanțele cu greutate moleculară mică (glicerol, dimetil sulfoxid, zaharoză etc.) și compuși macromoleculari (dextran, amidon, polietilen glicol, polivinilpirolidonă, agar-agar etc.) precum și unele componente de origine animală (ser de sânge, gelatină, lapte degresat etc.) sunt utilizate ca medii de protecție. Contactul preliminar al celulelor cu un crioprotector provoacă deshidratarea acestora, inhibarea activității unui număr de enzime și pregătește obiectele biologice pentru temperaturi scăzute, prevenind deteriorarea asociată temperaturii și șocului osmotic [10, 41, 42]. Rezultatele cercetătorilor brazilieni au arătat că alga diatomee *T. weissflogii* este bine conservată la temperatură ultra-joasă (-196°C) timp de 10 și 30 de zile cu 10% Me₂SO și 5% MeOH folosind răcire controlată (-80°C). Celulele de *N. oculata* au fost crioconservate cu succes prin congelare directă și răcire utilizând crioprotectori 5% Me₂SO, 10% Me₂SO, 5% MeOH. Rezultatele obținute indică dificultatea utilizării unui singur regim de congelare pentru diferite tipuri de microalge, deoarece sunt necesare studii suplimentare pentru a înțelege mai bine daunele celulare în timpul înghețului și decongelării pentru fiecare specie specific [18, 19, 20,38].

Cele mai utilizate două metode de crioconservare sunt: congelarea rapidă („vitricarea”), care este o răcire într-o singură etapă a cianobacteriilor și microalgelor în prezența unei concentrații mari de DMSO. Criobaloanele cu culturi sunt imersate direct în azot lichid la -196 °C. Această tehnică este ușor de implementat și previne formarea cristalelor de gheață [17].

A doua tehnică necesită o înghețare în două etape a culturilor celulare. Primul pas este răcirea lentă a celulelor pentru a reduce daunele cauzate de formarea gheții. Apoi, după congelare, criofiolele cu culturi sunt transferate în azot lichid. În mai multe studii, folosind un protocol în două etape, congelarea inițială a culturilor a fost realizată prin incubare la temperaturi de 4 °C, -30 °C, -40 °C și -80 °C. O metodă în două etape cu DMSO (10% v/v.) ca crioprotector este utilizată pentru a stoca majoritatea tulpinilor în colecția de culturi CCAP. Cu toate acestea, conform lui John G. Day rata optimă de răcire a suspensiei de celule de microalge este de 1-2 °C pe minut. Creșterea vitezei până la 5-10 °C/min reduce semnificativ procentul de celule de microalge viabile. În timpul etapei de recultivare crioflaconele sunt plasate într-o baie de apă la 40 °C pentru dezghetare, până când gheața dispare complet. Cultura este apoi utilizată ca inocul și transferată aseptice într-un mediu de creștere proaspăt (9-50 ml) fără crioprotectori și incubată [12, 14, 15]. Dezghetarea rapidă la 37-40 °C într-o baie de apă este considerată cea mai eficientă pentru *Arthrospira sp.* O tehnică de crioconservare de succes trebuie să asigure viabilitatea celulelor după decongelare și să nu existe o reducere semnificativă a viabilității în timpul depozitării pe termen lung. După dezghetarea unei celule crioconservate, starea sa fiziologică nu poate fi echivalentă cu cea de dinainte de înghețare. Prin urmare, există o anumită perioadă de recuperare, o fază de întârziere mai lungă în culturile de cianobacterie și microalge după decongelare față de o cultură care nu a fost supusă crioconservării. Nu a fost raportate rezultate despre deteriorarea genomului în tulpinile de alge crioconservate, care ar putea fi evidențiată prin pierderea caracteristicilor funcționale [13, 25, 28, 30].

Microorganismele care nu tolerează liofilizarea și deshidratarea pot fi stocate cu succes prin această metodă cu un titru celular viabil ridicat și stabil. Procariotele sunt mai rezistente la înghețarea ultrarapidă decât eucariotele. [38] Avantajele crioconservării față de liofilizare și uscare sunt timpul nelimitat de păstrare a culturilor, păstrarea activității biochimice și stabilitatea genetică, însă această metodă nu poate fi generalizată la toate speciile de microalgae [7].

O altă metodă utilizată în practica colecțiilor de culturi este **imobilizarea celulelor** care este utilizată de mult timp și este considerată promițătoare. Imobilizare celulară sau prinderea în matricea de gelificare este o altă alternativă de conservare pe termen lung a viabilității și funcționalității microbiene. Formarea de micro-picături sau mărgelile cu diferiți agenți de gelificare precum alginatul și guma arabică este o metodă bine cunoscută. Celulele microorganismelor imobilizate tolerează de obicei mai bine stresurile asociate cu conservarea în laborator. Imobilizarea poate crea un micromediu specific pentru celulele individuale în acest caz, matricea de imobilizare funcționează ca o capsulă sau glicocalix - o structură cu un stil de viață real și conservarea microorganismelor în condiții naturale [8]. Mai mulți factori precum dimensiunea, textura, porozitatea, raportul suprafață-volum și natura chimică a agenților de gelificare influențează viabilitatea și funcționalitatea celulelor în timpul conservării. Această metodă primește o atenție deosebită în industria probiotică datorită supraviețuirii și funcționalității ridicate a celulelor imobilizate în comparație cu alte metode de conservare și eliberare realizată în intestin după administrare. Mai multe organisme cu importanță probiotică precum *Bifidobacterium* și *Enterococcus* au fost conservate folosind această metodă, oferind un bun răspuns. Există date în literatura de specialitate cu privire la evaluarea comparativă a metodelor de păstrare pe termen lung a algelor marine și cianoprocarotelor imobilizate în sticlă, spumă, poliuretan, sfere de sticlă, agar, alginat, pe slant de agar. Algele marine fixate în agar și alginat au prezentat viabilitate ridicată și au germinat imediat când au fost însămânțate pe medii nutritive [8, 27]. Încapsulare urmată de uscare este o opțiune bună, spre deosebire de liofilizare ce nu a dat un răspuns bun datorat dezechilibrului osmotic și stresului oxidativ, în plus, adăugarea de crioprotectori și antioxidanți în matricea de gelificare oferă viabilitate și funcționalitate pe termen lung a celulelor prinse [33].

Astfel putem spune că numeroasele cercetări au arătat că nu există o singură metodă sau protocol de conservare și crioprotector care să funcționeze optim pentru fiecare tip de probă. Diferite probe și celule se comportă diferit cu diverși crioprotectanți și condiții de conservare. Prin urmare conceptul de conservare a microorganismelor este actual, relevant și atrage interesul oamenilor de știință de a dezvolta noi strategii optime de conservare a biodiversității microbiene pentru o perioadă lungă de timp, fără modificarea organizării, viabilității și funcționalității microorganismelor.

Bibliografie/referințe

1. ADAMS, J., *The Principles of Freeze_Drying*, Meth.Mol. Biol., 2007, vol. 368, pp. 15–38.
2. ARKAD'EVA Z.A. Faktory vliyayuschie na zhiznesposobnost' i svoystva mikroorganizmov prirazlichnykh metodah hraneniya [Factors affecting the viability and properties of microorganisms in various storage methods]. Biol. nauki. 1983. №4. P. 93–105.
3. BEKER M.E., Liepin'sh G.K., Kudryavtsev V.I. Liofilizatsiya bakterij [Lyophilization of bacteria]. In: Metody hraneniya kolleksij kul'tur [Methods for storing crop collections]. Nauka, Moscow, 1967. P. 119–130.
4. BELOUS A.M., Zhegunov G.F. Holodnyj anabioz. Rol' biologicheskikh membran [Cold suspended animation. The role of biological membranes]. In: Bekker M.E. (Ed.). Tormozhenie zhiznedeyatel'nosti kletok [Inhibition of cell activity]. Zinatne, Riga, 1987. P. 128–137.
5. BOND, C., *Cryopreservation of Yeast Cultures*, Meth.Mol. Biol, 2007, vol. 368, pp. 109–118.
6. BOND, C., *Freeze_Drying of Yeast Cultures*, Meth. Mol.Biol, 2007, vol. 368, pp. 99–108.

7. BUHMANN M.T., Day J.G., Kroth P.G. Post-cryopreservation viability of the benthic freshwater diatom *Planorhynchium frequentissimum* depends on light levels. *Cryobiology*. 2013. V.67. P. 23–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.005>
8. CHEN Y.C. Immobilized microalgae *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*. 2001. V.195, №1–2. P.71–80. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00540-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00540-8)
9. CORBETT L., Parker D.L. Viability of lyophilized cyanobacteria (Blue-Green Algae). *Applied and Environmental Microbiology*. 1976. V.32, №6. P. 777–780.
10. CROWE J.H., Oliver A.E., Hoekstra F.A. Crowe L.M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. *Cryobiology*. 1997. V.35, №1. P. 20–30. DOI:10.1006/cryo.1997.2020.
11. DANILOVA M.V., Nadirova I.M., Kudryavtsev V. I. Liofilizatsiya bakterij [Lyophilization of bacteria]. In: *Metody hraneniya kolleksiionnyh kul'tur* [Methods for storing crop collections]. Nauka, Moscow, 1967. P. 131–135.
12. DAY J.G, Proschold T., Friedl T., Lorenz M., Silva P.S. Conservation of microalgal type material: Approaches needed for 21st century science. *TAXON*. 2010. V.59, №1b. P.3–6. <http://www.jstor.org/stable/27757045>
13. DAY J.G. Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria. *Methods Mol Biol*. 2007; V.368.P. 141–151. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_10.
14. DAY, J. G. Cryopreservation methods for maintaining cultures / J.G. Day, J.J. Brand // In: *Algal Culturing Techniques*. Eds. R.A. Andersen. — Academic Press: New York, 2005. — P. 165-187
15. DAY J.G., DeVille M.M. Cryopreservation of Algae. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 1995. P. 81-89. DOI <https://doi.org/10.1385/0896032965>
16. DUYGU D.Y, Udoh A.U., Özer T, Erkaya I.A. The Characteristics and Importance of Microalgae Culture Collections. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*. 2017. V. 13, №1. P. 80–87.
17. FAHY, G. M. Principles of Cryopreservation by Vitrification / G.M. Fahy, B. Wolk // in: *Cryopreservation and Freeze- Drying Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1257. Eds. W.F. Wolkers, H. Oldenhof — Springer Science+Business Media: New York, 2015 — P. 21-82.
18. GUERMAZI, W. Microalgal cryopreservation using dimethyl sulfoxide (Me₂SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile / W. Guermazi, A. Sellami-Kammoun, J. Elloumi, Z. Drira, L. Aleya, R. Marangoni, H. Ayadi, S. Maalej // *Journal of Thermal Biology*. — 2010. — Vol. 35. — Issue 4. — P. 175-181.
19. HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubálek // *Cryobiology*, 2003, Vol. 46. Issue 3, P. 205-229
20. ITURRIAGA R., Sullivan C.V. Long-term preservation of microalgal cells and their optical properties. *Oceanography*. 2015. V.3, №1. P. 2332–2632. doi:10.4172/2332-2632.1000134
21. KOMAGATA K. (2000). The present and future of the Asian Network on Microbial Research. *Proceedings of the International Workshop on Asian Network on Microbial Research*, Bangkok, Thailand. August 28 - 29, 2000.
22. KRÖGER M., Klemm M., Nelles M. Extraction behavior of different conditioned *S. rubescens*. *Energies*. 2019. V.12, №7. P. 1336–1343. <https://doi.org/10.3390/en12071336>
23. KUPLETSKAYA M. B. and Netrusov A. I. Viability of Lyophilized Microorganisms after 50 Year Storage ISSN 00262617, *Microbiology*, 2011, Vol. 80, No. 6, pp. 850–853.
24. KUPLETSKAYA, M.B., *Lyophilization of Saprophytic Microorganisms*, *Mikrobiologiya*, 1961, vol. 30, no. 4
25. KWEI, C. K. Elucidation and Isolation of Specific bioactive compound in cyanobacteria isolates: Thesis / Chee Kuan Kwei // University of Adelaide. Australia, 2012— 232
26. LIN L.P. Microstructure of spray-dried and freeze-dried microalgal powders. *Food microstructure*. 1985. V.4, №2. P. 341–348.
27. LUZ E. De-B., Bashan Y. Joint Immobilization of Plant Growth-Promoting Bacteria and Green Microalgae in Alginate Beads as an Experimental Model for Studying Plant-Bacterium Interactions. *Applied and environmental microbiology*. 2008. V.74, №21. P. 6797–6802. doi:10.1128/AEM.00518-08
28. MARKELOVA, A. G. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability / *Journal of Plant Physiology*. — 2000. — Vol. 47. — Issue 6. — P. 815-819. McLellan M. R.

- Cryopreservation of diatoms. *Diatom Research*. 1989. №4:2. P. 301–318, DOI:10.1080/0269249X.1989.9705078
29. MCGRATH M.R., Daggett P.-M., Dilworth S. Freeze drying of algae: Chlorophyta and Chrysophyta. *Journ. Phycol.* 1978. V.14, №4. P. 521–525. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1978.tb02480>.
30. MOTHAM, M. High Subzero Temperature Preservation of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) and Its Ultrastucture / M. Motham, Y. Peerapornpisal, S. Tongsriri, Ch. Pumas, P. Vacharapiyasophon // *Chiang Mai Journal of Science*. — 2012. — Vol. 39. — Issue 4. — P. 554-561.
31. PARK H.K. Long-term Preservation of Bloom-forming Cyanobacteria by Cryopreservation. *Algae*. 2006. V.21, № 1. P. 125–131.
32. PIASECKI B.P., DILLE K.R., BRAND J.J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density. *Cryobiology*. 2009. V.58. P. 103–109. doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.001
33. PRAKASH OM, YOGESH S. NIMONKAR, DHANANJAY DESAI A. Recent Overview of Microbes and Microbiome Preservation May 2020 *Indian Journal of Microbiology* 60(3) DOI:10.1007/s12088-020-00880-9
34. RHODES, L. Cryopreservation of economically valuable marine micro — algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae / L. Rhodes, J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, M. Decker // *Cryobiology*. — 2006. — Vol. 52. — Issue 1. — P. 152-156. Salas-Leiva J.S., Dupré E. Cryopreservation of the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen): analysis of the effect of DMSO temperature and light regime during different equilibrium periods. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2011. V.39, №2. P. 271–279. DOI: 10.3856/vol39-issue2-fulltext-8
35. SIDYAKINA T.M. Metody konservatsii mikroorganizmov [Microorganism Preservation Methods]. In: *Seriya «Konservatsiya geneticheskikh resursov»* [Series "Conservation of genetic resources"]. ONTINTSBI AN SSSR, Puschino, 1988. P. 58
36. STACEY, J.N. and Day, J., Long_Term ex_situ Conservation of Biological Resources and the Role of Biological Resource Centers, *Meth. Mol. Biol.*, 2007, vol. 368, pp. 1–14.
37. TANNIOU A., TURPIN V., LEBEAU TH. Comparison of cryopreservation methods for the long-term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Cryobiology*. 2012. V.65, №1. P. 45–50. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2012.03.011
38. TESSAROLLI L.P., DAY J.G., HENRIQUES A.A. Vieira1 Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar), São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*. 2017. V.17, №2. e20160299. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2016-0299>
39. TINDALL, B.J., Vacuum_Drying and Cryopreservation of Prokaryotes, *Meth. Mol. Biol*, 2007, vol. 368, pp. 73–98.
40. WESSMAN P., HÅKANSSON S., LEIFER K., RUBINO S. Formulations for Freeze-drying of Bacteria and Their Influence on Cell Survival. *J. Vis. Exp.* 2013. V.78. P. 4058.
41. WOMERSLEY C., USTET P.S., RUDOLPH A.S., CROWE J.H. Inhibition of dehydration-induced fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. *Cryobiology*. 1986. V.23, №3. P. 245–255. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90050-7)
42. ZDENEK H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003. V.46, №3. P. 205–229. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
43. KHARCHUK IRINA A. The review of methods of the long-term storage of microalgae and cyanobacteria cultures used in collections of the world federation of cultures (WFCC) in WDCM CCINFO base Article in *Issues of modern algology (Вопросы современной альгологии)* • January 2019 DOI: 10.33624/2311-0147-2019-3(21)-1-27
44. TAYLOR, R. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies / R. Taylor, R. Fletcher // *Journal of Applied Phycology*, 1998, Vol. 10, Issue 5., P. 481-501.
45. ГРОМОВ, Б. В. Биоразнообразие цианобактерий: основы, дальнейшее выявление и перспективы сохранения в свете проблем экологии России // *Микробиология*, 1993, Т. 62. № 3. С. 406-420.
46. ЗАВАРЗИН, Г. А. Планета бактерий / Г.А. Заварзин // *Вестник Российской академии наук*. 2008, Т. 78., № 4., С. 328-336.
47. КОКШАРОВА, О. А. Применение методов молекулярной генетики и микробиологии в экологии и биотехнологии цианобактерий / О.А. Кокшарова // *Микробиология*, 2010, Т. 79, № 6, С. 734-747.